

# Bond™ Oracle™ HER2 IHC System bruksanvisningar

För användning i Leica Biosystems BOND helautomatiserade, avancerade infärgningssystem.

Product Code TA9145 är avsedd att färga in 60 test (150 objektglas):

60 testobjektglas med HER2 Primary Antibody

60 testobjektglas med HER2 Negative Control

15 HER2 Control Slides med HER2 Primary Antibody

15 positiva interna vävnadskontroller 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

# Innehåll

<b>Avsedd användning</b> .....	<b>3</b>
<b>Summering och förklaring</b> .....	<b>3</b>
Bakgrund .....	3
Förekomst av HER2 .....	3
Summering av klinisk konkordans .....	3
<b>Procedurprinciper</b> .....	<b>4</b>
Komponenter som ingår .....	4
Anvisningar om användning .....	5
Förvaring och stabilitet .....	5
Förberedelse av preparat .....	5
Varningar och försiktighetsåtgärder .....	5
<b>Procedur</b> .....	<b>6</b>
A. Reagenser som krävs men inte ingår .....	6
B. Utrustning som krävs men inte ingår .....	6
C. Metodik .....	6
D. Layout för objektglas .....	6
E. Procedursteg .....	7
<b>Kvalitetskontroll</b> .....	<b>9</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	10
Intern positiv kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody .....	10
Intern komponent för negativ kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody .....	10
Patientvävnad – HER2 Negative Control .....	10
Patientvävnad – HER2 Primary Antibody .....	10
Testverifiering .....	11
Tolkning av infärgning .....	11
<b>Förklaring till undersökningsordning för objektglas</b> .....	<b>12</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	12
2. Intern positiv kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody .....	12
3. Intern komponent för negativ kontrollvävnad – HER2 Positive Control .....	12
4. Patientvävnad – infärgad med HER2 Negative Control .....	12
5. Patientvävnad – infärgad med HER2 Primary Antibody .....	12
<b>Begränsningar</b> .....	<b>12</b>
A. Allmänna begränsningar .....	12
B. Produktspecifika begränsningar .....	13
<b>Cellinjedata</b> .....	<b>14</b>
<b>Klinisk konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest</b> .....	<b>14</b>
2x2 konkordansresultat .....	15
3x3 konkordansresultat .....	15
<b>Klinisk konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System jämfört med PathVysion HER-2 DNA Probe Kit</b> .....	<b>16</b>
3x2 konkordansresultat .....	16
<b>Immunoreaktivitet – normal panel</b> .....	<b>17</b>
<b>Reproducerbarhetsstudie</b> .....	<b>18</b>
Inom och mellan precisionstest .....	18
A. Precisionstest inom körning .....	18
B. Precisionstest mellan körningar .....	18
C. Reproducerbarhet från parti till parti .....	18
D. Reproducerbarhet mellan laboratorier .....	19
E. Reproducerbarhet mellan observatörer .....	20
F. Precision mellan instrument (BOND-MAX v BOND-III) .....	20
<b>Felsökning</b> .....	<b>21</b>
<b>Referenser</b> .....	<b>23</b>

## Avsedd användning

### För användning inom in vitro-diagnostik

Bond Oracle HER2 IHC System är ett semikvantitativt immunohistokemiskt (IHC) test för att bestämma onkoproteinstatus enligt HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) i bröstcancervävnad för histologisk utvärdering. Bond Oracle HER2 IHC System är avsett som hjälp för bedömning av patienter för vilka behandling med Herceptin® (trastuzumab) övervägs (se Herceptin®-paketinsatsen).

Obs! Alla patienter i kliniska försök med Herceptin® blev valda med en undersökande immunocytochemiskt kliniskt försökstest (CTA). Inga av patienter i dessa försök var valda med Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System har jämförts med Dako HercepTest™ i en oberoende uppsättning prov och har visat sig ge acceptabla konkordansresultat, vilket visas i Summering av klinisk konkordans. Den faktiska korrelationen av Bond Oracle HER2 IHC System till det kliniska resultatet har inte fastställts.

### Summering och förklaring

#### Bakgrund

Bond Oracle HER2 IHC System innehåller den musmonoklonala anti-HER2-antikroppen, klon CB11. Klon CB11, ursprungligen utvecklad av Corbett et al (1) och tillverkad av Novocastra Laboratories Ltd (numera Leica Biosystems Newcastle Ltd), är inriktad mot HER2-onkoproteinetns invändiga domän.

I en del av gruppen bröstcancerpatienter, är HER2-onkoproteinet överproducerat som del av processen med malign omvandling och tumörens progression (2). Överproduktion av HER2-onkoproteinet som hittats i bröstcancer celler ger idén till HER2 som ett mål för en antikroppsbaseerad terapi. Herceptin® är en människoanpassad monoklonal antikropp (3) som med hög affinitet binder till HER2-onkoproteinet och har visat sig förhindra spridningen av mänskliga tumörceller som överproducerar HER2-onkoproteinet både in vitro och in vivo (4–6). Allt sedan den första tekniken med immunoperoxidas, rapporterad av Nakane och Pierce (7), har flera utvecklingar uppstått inom fältet för immunohistokemin, vilket har resulterat i ökad sensitivitet. En aktuell utveckling har varit användningen av polymerisk märkning. Denna teknik har tillämpats både på primära antikroppar och immunohistokemiska upptäckssystem (8). Upptäckssystemet Compact Polymer™ som används i Bond Oracle HER2 IHC System ingår i gruppen innovativa, kontrollerade polymeriseringstekniker som har särskilt utvecklats för att preparera polymeriska HRP-kopplade antikropps-konjugat. Eftersom denna polymerteknik används i Oracles produktutbud uppstår inte problemet med icke-specifik endogen biotinfärgning, som kan inträffa i streptavidin-/biotinupptäckssystem.

#### Förekomst av HER2

HER2-onkoproteinet uttrycks på nivåer som kan upptäckas av immunohistokemi i upp till 20 % av adenocarcinom från olika platser. Mellan 10 % och 20 % av invasiva duktala carcinom i bröst är positiva för HER2-onkoproteinet (9). 90 % av fallen av duktal carcinom in situ (DCIS) av komedontyp är positiva (10), tillsammans med nästan alla fall av Pagets sjukdom i bröstet (11).

#### Summering av klinisk konkordans

Bond Oracle HER2 IHC System har utvecklats för att erbjuda ett alternativ till den undersökande CTA (Clinical Trial Assay - kliniska försökstest) som används i kliniska studier med Herceptin®. Prestanda hos Bond Oracle HER2 IHC System för att fastställa överförekomst av HER2-onkoproteinet har utvärderats i en oberoende studie där resultaten från Bond Oracle HER2 IHC System jämfördes med Dako HercepTest på 431 brösttumörprov i USA. Inga av dessa brösttumörprov har erhållits från patienter i kliniska försök med Herceptin®. Resultaten visar en konkordans på 92,34 % i en 2x2-analys (95 % konfidensintervall på 89,42 % till 94,67 %) och 86,54 % i en 3x3-analys (95 % konfidensintervall på 82,95 % till 89,62 %) mellan resultat från de två testen.

## Procedurprinciper

Bond Oracle HER2 IHC System innehåller komponenter som krävs för att slutföra en immunohistokemisk infärgningsprocedur för formalinfixerade, paraffinbäddade vävnader. Efter inkubering med den färdigberedda HER2 Primary Antibody (klon CB11) används den bruksfärdiga kompakta polymertekniken av systemet. Den enzymatiska omvandlingen av de därefter tillagda kromogena resultaten i utformningen av en synlig reaktionsprodukt på den antigeniska platsen. Vävnadssnittet kan då bli motinfärgade, dehydrerade, rensade och monterade. Resultaten tolkas med ljusmikroskop. Kontrollobjektglaset med fyra formalinfixerade, paraffinbäddade mänskliga bröstcancer cellinjer tillhandahålls för att validera infärgningskörningarna. De fyra cellinjerna visar förekomst av HER2-onkoprotein vid intensiteter på 0, 1+, 2+ och 3+. Infärgningsintensiteterna hos dessa cellinjer korrelerar till både receptorbelastning per cell med HER2-onkoprotein och status för HER2-genförstärkning.

Bond Oracle HER2 IHC System (produktkod TA9145) används i Leica Biosystems BOND helautomatiserade, avancerade infärgningssystem.

## Komponenter som ingår

Materialet i listan nedan (tabell 1) räcker för att färga in 150 objektglas (60 testobjektglas inkuberade med HER2 Primary Antibody, 60 motsvarande testobjektglas inkuberade med HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides inkuberade med HER2 Primary Antibody och 15 interna positiva vävnadskontroller inkuberade med HER2 Primary Antibody). Antalet test baseras på användning av en automatiserad dosering på 150 µl per objektglas. Satsen innehåller tillräckligt med material för maximalt 15 enskilda BOND-infärgningskörningar.

<b>HER2 Control Slides, (x15)</b>	Snitt av formalinfixerade, paraffinbäddade, mänskliga bröstcancer cellinjer som visar förekomst av HER2-onkoprotein vid infärgningsintensiteter på 0, 1+, 2+ och 3+ vid infärgning enligt det protokoll som medföljer. Dessa snitt är helt fästa och kräver inte ytterligare uppvärmning.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 ml</b>	Innehåller bruksfärdiga, affinitetsrenad, musmonoklonal IgG-antikropp, klon CB11 och 0,035 % 2-metylisotiazol 3(2H)-on.
<b>HER2 Negative Control, 9 ml</b>	Innehåller bruksfärdig mus-IgG med en ekvivalent koncentration jämfört med HER2 Primary Antibody och 0,035 % 2-metylisotiazol 3(2H)-on.
<b>Peroxide Block, 22,5 ml</b>	Innehåller 3-4 % väteperoxid.
<b>Post Primary, 22,5 ml</b>	Anti-mus-IgG (<10 µg/ml) från kanin i TRIS-buffrad saltlösning som innehåller 10 % (v/v) djurserum och 0,01 % 2-metylisotiazol 3(2H)-on.
<b>Polymer, 22,5 ml</b>	Poly-HRP anti-kanin-IgG (<25 µg/ml) från get i TRIS-buffrad saltlösning som innehåller 10 % (v/v) djurserum och 0,01 % 2-metylisotiazol 3(2H)-on.
<b>DAB Part 1, 2,25 ml</b>	Innehåller 66 mm 3,3'-diaminobensidintetrahydroklorid i en stabil lösning.
<b>DAB Part B (x2), 22,5 ml</b>	Innehåller ≤0,1 % (v/v) väteperoxid.
<b>Hematoxylin, 22,5 ml</b>	Innehåller <0,1 % hematoxylin.

Tabell 1. Bond Oracle HER2 IHC System – komponenter

## Anvisningar om användning

Alla reagenser som tillhandahålls är särskilt utformade för användning med detta test och partinumren är specifika för varje Bond Oracle HER2 IHC System. Testet kan inte giltigförklaras om några komponenter bytes ut.

## Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys inte in. Återför till 2–8 °C direkt efter användning. Avvikelser från dessa villkor gör att testet ogiltigförklaras. Kontrollera att utgångsdatumet för det Bond Oracle HER2 IHC System som används inte har förfallit. Tecken som påvisar kontamination och/eller instabilitet för Bond Oracle HER2 IHC System är: lösningarna blir grumliga, lukt uppkommer och att det uppstår fällningar. Förvaringsvillkor som skiljer sig från ovan nämnda måste verifieras av användaren.

## Förberedelse av preparat

Alla preparat måste förberedas för att bevara vävnaden för immunohistokemisk infärgning. Standardmetoder för vävnadsbearbetning ska användas för alla preparat (12).

Vi rekommenderar att vävnader prepareras i formalinbaserat fixermedel och normalt bearbetas och paraffinbäddas. Resektionspreparat ska till exempel segmenteras till en tjocklek på 3–4 mm och fixeras under 18–24 timmar i 10 % neutralbuffrad formalin. Vävnaderna ska sedan dehydreras i en serie alkoholer och renas med xylol, följt av impregnering med smält paraffinvax, under högst 60 °C. Vävnadspreparat ska snittas i 3–5 µm.

Objektglas som krävs för utvärdering av HER2-onkoprotein och tumörbekräftelse ska förberedas samtidigt. För att bevara antigeniciteten ska vävnadssnitt som har monterats på objektglas i (Leica Biosystems Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides – produktkod 3800040) infärgas inom 4–6 veckor efter snittningen om den utförs vid rumstemperatur (18–24 °C). Vi rekommenderar att objektglaset inkuberas i 12–18 timmar (över natten) vid 37 °C efter snittningen. De snitt som kräver ytterligare vidhäftning kan inkuberas vid 60 °C under ytterligare en timme.

I USA krävs det i Clinical Laboratory Improvement Act of 1988, i 42 CFR 493.1259(b) att "Laboratoriet måste behålla infärgade objektglas under minst tio år från undersökningsdatumet och att preparatsegment behålls minst två efter undersökningsdatumet".

## Varningar och försiktighetsåtgärder

*Endast för professionella användare.*

En eller flera av komponenterna i produkten är farliga material.

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

Symptom på överexponering av ProClin™ 950, det konserveringsmedel som används i Oracle-reagenserna, kan vara hud- och ögonirritationer och irritationer på slemhinnorna och de övre luftvägarna. Koncentrationen av ProClin™ 950 i produkten är maximalt 0,35 %. Dessa lösningar uppfyller inte OSHA-kriterierna på farliga ämnen. Ett MSDS (Material Safety Data Sheet) kan beställas eller hämtas från [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

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

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

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

## Procedur

### A. Reagenser som krävs men inte ingår

- BOND Dewax Solution (produktkod AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (produktkod AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (produktkod AR9590)
- Standardlösningar som används i immunohistokemi (t.ex. etanol, absolut och graderad)
- Xylen (eller xylen substitut)
- Monteringsmedel
- Destillerat eller avjoniserat vatten

### B. Utrustning som krävs men inte ingår

- Leica Biosystems BOND-MAX och BOND-III helautomatiserade, avancerade infärgningssystem
- BOND Universal Covertiles (produktkod S21.2001, S21.4583 eller S21.4611)
- BOND Mixing Stations (produktkod S21.1971)
- Torkugn som kan hålla 60 °C
- Ljuskroskop (4–40x objektivförstoring)
- Objektglas (Leica Biosystems Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides – produktkod 3800040)
- Täckglas
- BOND Slide Label & Print Ribbon (produktkod S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (produktkod CS9100)

### C. Metodik

- Innan användaren påbörjar metodiken ska denne vara utbildad i BONDs helautomatiserade immunohistokemiska tekniker.
- Varje testsnitt som ska infärgas med HER2 Primary Antibody kräver ett identiskt snitt för infärgning med HER2 Negative Control. Det negativa kontrollsnittet medger differentiering mellan specifik och icke-specifik infärgning på antigenplatsen. Varje BOND-infärgningskörning måste inkludera ett HER2 Control Slide. Mot slutet av infärgningsprotokollet visas körningen som ogiltig, om cellinjerna inte visar korrekta infärgningsmönster (mer information i Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide).

### D. Layout för objektglas

En ny BOND Universal Covertile (produktkod S21.2001, S21.4583 eller S21.4611) ska användas med varje objektglas. Användning av BOND Universal Covertiles som tidigare inte har begagnats för varken immunohistokemisk infärgning eller in situ-hybridiseringsinfärgning har inte validerats med detta test.

Med layouten av objektglasbrickan (tabell 2) aktiveras optimala prestanda för Bond Oracle HER2 IHC System och de fullständiga 60 test som ska utföras.

Objektglasposition	Beskrivning av objektglas	Reagens	Vävnadstyp	Objektglasikon
1	Fall 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Fall 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Fall 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Fall 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Fall 1	*HER2 Primary Antibody	Test	
6	Fall 2	*HER2 Primary Antibody	Test	
7	Fall 3	*HER2 Primary Antibody	Test	
8	Fall 4	*HER2 Primary Antibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Positiv	
10	Intern vävnadskontroll	*HER2 Primary Antibody	Positiv	

Tabell 2. Layout av objektglasbricka med vävnadstyp och reagens

## E. Procedursteg

Följ stegen nedan för att sätta upp en objektglasbricka med den layout som beskrivs i tabell 2. Anvisningarna ska läsas tillsammans med BOND System User Manual.

1. Kontrollera på BOND-instrumentet att behållarna för bulk och riskavfall har tillräcklig kapacitet för att utföra de infärgningskörningar som ska utföras.
2. Kontrollera att det finns tillräckligt med alkohol, destillerat eller avjoniserat vatten, BOND Dewax Solution (levererad som färdig att använda), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (levererad som färdig att använda) och BOND Wash Solution (levererad som x10 koncentrat) i bulkreagensbehållare för att utföra de infärgningskörningar som krävs.
3. Kontrollera att en ren BOND Mixing Station har installerats.
4. Aktivera BONDS helautomatiserade, avancerade infärgningssystem.
5. Slå på BOND kontrollenheten som är ansluten till det helautomatiserade, avancerade BOND-infärgningssystemet.
6. Starta BOND-programmet.
7. Vid den första användningen av Bond Oracle HER2 IHC System, skannas streckkoderna på reagensbrickan med den handhållna skannern för att föra in systemet i BONDS reagenslager.

8. Gå till inställningsskärmen för objektglas och klicka på **Add case**.
9. Ange uppgifter om det första fallet. Se till att doseringsvolymen är satt till **150 µl** och att prepareringsprotokollet är **\*Dewax**. Klicka på OK.
10. Klicka på **Add slide** med fallet markerat på skärmen med objektglasinställningar.
11. Lägg först till objektglasen för patienttestet. Kontrollera att vävnadstypen är satt till **Test tissue**.
12. Bekräfta att doseringsvolymen är satt till **150 µl** och att prepareringsprotokollet är **\*Dewax**.
13. Välj värden för infärgningsläge – **Single** och **Oracle** (klicka inte på **Oracle control**).
14. Välj process **IHC**.
15. Välj **\*HER2 Negative Control** i markörlistan. Protokollfliken standardinställs till korrekt infärgningsprotokoll (**\*IHC Protocol H**) och HIER-protokoll (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Klicka på **Add slide**. Nu skapas det negativa kontrollreagensobjektglaset.
17. Stanna kvar i dialogrutan Add slide och välj **\*HER2 Primary Antibody** i markörlistan. Standardprotokoll och övriga inställningar kvarstår oförändrade.
18. Klicka på **Add slide**. Testobjektglaset skapas.
19. Upprepa steg 8 till 18 tills alla fall och patienttestobjektglas har skapats.
20. Skapa sedan HER2 Control Slide. Lägg till det i det senaste fallet eller skapa ett nytt fall för kontrollobjektglas, beroende på din vanliga laboratoriepraxis.  
  
Viktigt! Det är obligatoriskt i Bond Oracle HER2 IHC System att ett HER2 Control Slide ingår i varje körning (d.v.s. objektglasbricka) för att testet ska kunna valideras.
21. Sätt vävnadstyp till **Positive tissue** i dialogrutan Add slide.
22. Klicka på **Oracle control**.
23. Välj ett partinummer för HER2 Control Slide i listan **Lot No**. Partinumret är inskrivet på objektglasets etikett.  
  
Viktigt! HER2 Control Slide måste komma från det Bond Oracle HER2 IHC System som kommer att användas.
24. Välj **\*HER2 Primary Antibody** i markörlistan. Behåll doseringsvolymen, infärgningsläget, process- och protokollinställningarna.
25. Klicka på **Add slide** för att lägga till HER2 Control Slide.
26. Lägg slutligen till ett objektglas för positiv intern vävnadskontroll.
27. Avmarkera **Oracle control**.
28. Välj **\*HER2 Primary Antibody** i markörlistan. Behåll doseringsvolymen, infärgningsläget, process- och protokollinställningarna. Vävnadstyp kvarstår som **Positive tissue**.
29. Klicka på **Add slide**. Nu är objektglasuppläggnen klar.
30. Skriv ut objektglasetiketter. Alla Oracles objektglasetiketter har "OC" tryckt på dem. På etiketten till HER2 Control Slide finns också partinumret för Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Etikettera objektglasen på lämpligt sätt.
32. Öppna locken på alla behållare i Bond Oracle HER2 IHC System och ladda reagensbricka i BOND.



33. Placera objektglaset på objektglasbrickan i den ordning som visas i avsnitt D, tabell 2. Använd nya Covertiles.
34. Lägg in objektglasbrickan i BOND och tryck på knappen **Load/Unload**.
35. Bekräfta att objektglaset har skannats och klicka på knappen **Run (Play)** på skärmen med systemstatus.
36. Se till att indikatorfältet för brickan visar **Proc (OK)** och att satsnummer och sluttid visas.
37. När körningen är klar trycker du på knappen **Load/Unload** och tar bort objektglasbrickorna från BOND.
38. Ta bort Covertiles och skölj objektglaset i avjoniserat vatten.
39. Torka, rensa och montera snitten.

## Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsfixering, bearbetning och inbäddning i användarens laboratorium kan ge betydligt variabelt resultat, vilket gör det nödvändigt med regelbundna prestanda för de interna kontrollerna förutom de HER2 Control Slides som levereras från Leica Biosystems<sup>1</sup> i Bond Oracle HER2 IHC System. Rådfråga riktlinjerna för kvalitetskontroll i College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Se även CLSI (tidigare NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12) och Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (13). Granska också tabell 3 nedan för typerna av immunohistokemiska kvalitetskontroller och deras ändamål.

Prov*	Beskrivning	HER2 Primary Antibody-infärgning	HER2 Negative Control-infärgning
<b>HER2 Control Slide</b>	Enligt leverans i Bond Oracle HER2 IHC System.	Kontrollerar infärgningsproceduren och indikerar validitet av reagensprestanda.	
<b>Intern positiv kontrollvävnad</b>	Vävnad som innehåller målantigen. Den idealiska kontrollen är svagt positiv infärgningsvävnad så att subtila ändringar i den primära antikroppssensitiviteten kan identifieras.	Kontrollerar alla steg i analysen. Validerar vävnadsförberedelse och infärgningsprestanda hos Bond Oracle HER2 IHC System.	Identifiering av icke-specifik bakgrundsinfärgning
<b>Intern komponent för negativ kontrollvävnad</b>	Vävnader eller celler förväntas vara negativa (Kan finnas i patientvävnad eller positiva/negativa kontrollvävnadskomponenter).	Identifiering av icke-specifik antikropskorsreaktivitet mot celler/cellulära komponenter.	

\*Fixerad och bearbetad per patientprov

Tabell 3. Immunohistokemiska kvalitetskontroller med syfte

Kontrollvävnad ska vara biopsipreparat eller kirurgiska preparat, formalinfixerade, bearbetade och paraffinbäddad så snart som möjligt och på samma sätt som patientproverna. Preparaten

måste hanteras på lämpligt sätt för att vävnadens antigenicitet behålls för immunohistokemisk infärgning. Standardmetoder för vävnadsbearbetning ska användas för alla preparat (12).

### **HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody**

Vart och ett av de medföljande HER2 Control Slides innehåller fyra formalinfixerade, paraffininbäddade mänskliga biopsier med bröstcancer cellinjen med infärgningsintensitetsvärden på 0, 1+, 2+ och 3+. Ett objektglas måste ingå i varje testkörning (d.v.s. objektglasbricka). Den korrekta utvärderingen av HER2 Control Slide som tillhandahålls av Leica Biosystems' indikerar testvaliditeten (mer information i Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Den HER2 Control Slides som levereras med systemet validerar endast reagensprestanda och verifierar inte vävnadspreparering.

### **Intern positiv kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody**

Om interna positiva kontrollvävnadskomponenter används, ska de vara biopsipreparat eller kirurgiska preparat, formalinfixerade, bearbetade och paraffininbäddade så snart som möjligt och på samma sätt som patientproverna. Positiva vävnadskontroller indikerar korrekt preparerade vävnader och giltiga infärgningstekniker. Minst en positiv kontrollkomponent ska ingå i varje testkörning. Det positiva kontrollsnittet ska visa svagt positiv infärgning så att subtila ändringar i den primära antikroppssensitiviteten kan identifieras.

Obs! Kända positiva kontrollvävnadskomponenter ska endast användas för övervakning av korrekt prestanda för bearbetade vävnader tillsammans med testreagenser, INTE som hjälp till att formulera en specifik tolkning av patientprov. Om de positiva kontrollvävnaderna inte kan visa lämplig positiv infärgning, ska de resultat som erhålls med patientprov anses vara ogiltiga. Ett multivävnadskontrollsegment som innehåller tumörer som visar alla 4 HER2-grader kan också användas effektivt som lämpligt inbyggt kontrollmaterial.

### **Intern komponent för negativ kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody**

Om interna negativa kontrollvävnadskomponenter används, ska de vara färskas biopsipreparat eller kirurgiska preparat, fixerade, bearbetade och inbäddade så snart som möjligt och på samma sätt som patientproverna. Med användning av kontrollvävnad, känd att vara HER2-onkoproteinnegativ, verifieras med varje infärgningskörning specificiteten hos den primära antikroppen och ger en indikering om eventuell icke-specifik bakgrundsinfärgning. Skillnaderna mellan olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt ger interna negativa kontrollplatser (detta ska verifieras av användaren). Normala bröstkanaler som inte kan kopplas till tumörer kan bilda referens till testets validitet. Om specifik infärgning uppstår i den interna negativa kontrollvävnaden ska resultat med patientpreparat anses vara giltiga.

Användning av multivävnadskontrollsegment som representerar alla fyra HER2-grader kan användas i negativa och positiva kontrollvävnaders syfte.

### **Patientvävnad – HER2 Negative Control**

Använd medföljande HER2 Negative Control i stället för HER2 Primary Antibody på ett motsvarande snitt för varje patienttest för att utvärdera icke-specifik infärgning och medge exakt tolkning av specifik HER2-onkoproteinsinfärgning på den antigeniska platsen.

### **Patientvävnad – HER2 Primary Antibody**

Positiv infärgningsintensitet ska bedömas inom sammanhanget av eventuell icke-specifik bakgrundsinfärgning med HER2 Negative Control. Som med alla immunohistokemiska test, innebär ett negativt resultat att antigenen inte har identifierats, inte att antigenen var frånvarande i de testade cellerna/vävnaderna. Mer specifik information finns i **Förklaring till undersökningsordning för objektglas, Begränsningar, Utvärdering av prestanda och Immunoreaktivitet** om immunoreaktivitet för Bond Oracle HER2 IHC System.

### **Testverifiering**

Innan ett antikropps- eller infärgningssystem används för första gången i en diagnosprocedur, ska

användaren verifiera antikroppens specificitet genom att testa den på en serie interna vävnader med kända immunohistokemiska positiva och negativa profiler. Läs igenom **Kvalitetskontroll** som beskrivits tidigare och de krav på kvalitetskontroll som finns i CAP Certification Program for Immunohistochemistry och/eller CLSI (tidigare NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12). Dessa kvalitetskontrollprocedurer ska upprepas för varje ny antikroppsparti eller närhelst testparametrarna ändras. Mänskligt invasivt (infiltrativt) ductalt bröstcarcinom med kända infärgningsintensiteter för HER2-onkoprotein från 0 till 3+ och andra lämpligt negativa vävnader passar för testverifiering.

## Tolkning av infärgning

För att avgöra förekomst av HER2-onkoprotein ska endast membraninfärgningsmönster och intensitet utvärderas med den skala som visas i tabell 4. En patolog med ett ljusfältsmikroskop bör utföra utvärderingen av objektglaset. Ett objektiv med en förstoring på 10x är lämplig för utvärdering av immunohistokemisk infärgning och bedömning. Användning av objektiv med en förstoring på 20–40x ska användas när bedömningen bekräftas. Cytoplasmisk infärgning ska beaktas som icke-specifik infärgning och inte tas med i bedömningen av membraninfärgningsintensiteten (14). Som hjälp till att skilja mellan infärgningar av typen 0, 1+, 2+ och 3+ finns Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide där det finns bilder av de olika infärgningsintensiteterna. Endast preparat från patienter med invasivt bröstcarcinom ska bedömas. Vid fall med carcinom *in situ* och invasivt carcinom i samma preparat ska bara den invasiva komponenten bedömas.

Immunohistokemiskt infärgningsmönster	Poäng	Bedömning
Ingen infärgning har observerats eller också har membraninfärgning observerats i mindre än 10 % av tumörcellerna.	0	Negativ
Svag/knappt märkbar membraninfärgning har identifierats i mer än 10 % av tumörcellerna. Cellerna är bara infärgade i delar av membranet.	1+	Negativ
Svag till moderat hel membraninfärgning har observerats i mer än 10 % av tumörcellerna.	2+	Osäker (svagt positiv)
Kraftig hel membraninfärgning har observerats i mer än 10 % av tumörcellerna.	3+	Starkt positiv

Tabell 4. Tolkning av HER2-infärgning

Infärgningsresultat i Bond Oracle HER2 IHC System tolkas som negativa för förekomst av HER2-onkoprotein med poäng för infärgningsintensitet på 0 och 1+, osäkra (svagt positiva) med poäng för infärgningsintensitet på 2+ och starkt positiva med poäng för infärgningsintensitet på 3+. Bond Oracle HER2 IHC System är inte avsett att ge prognosinformation till patienten och/eller läkaren och har inte validerats för det ändamålet. Objektglaset ska undersökas i den ordning som visas nedan för varje infärgningsbedömning för att avgöra validiteten hos infärgningskörningen och aktivera den semikvantitativa bedömningen av infärgningsintensitet i provvävnaden.

## Förklaring till undersökningsordning för objektglas

Objektglaset ska undersökas i följande ordning:

## 1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Ett giltigt test med Oracle HER2 Control Slide visar följande:

- Förekomst av kraftigt brun, hel cellmembraninfärgning i kontrollcellinje 3+, SK-BR-3.
- Förekomst av svag till moderat brun, hel cellmembraninfärgning i kontrollcellinje 2+, MDA-MB-453.
- Förekomst av svag/knappt märkbar brun, hel cellmembraninfärgning i kontrollcellinje 1+, MDA-MB-175.
- Ingen infärgning i kontrollcellinje 0, MDA-MB-231.

Viktigt! En funktion i kontrollcellinje MDA-MB-175 1+ är ett tydligt tillväxtnöster där cellerna bildar kluster. Dessa kluster ger upphov till en kontinuerlig luminal borstbrämsregion över cellklustret. Denna borstbrämsinfärgning kommer att bli starkare än resten av cellmembranet. Det är den svaga/knappt märkbara ofullständiga cellmembransinfärgningen som är det korrekta infärgningsmönstret 1+ för HER2-onkoproteinet. Prickliknande immuninfärgning av cytoplasmas Golgi-område kan också observeras i denna cellinje.

## 2. Intern positiv kontrollvävnad – HER2 Primary Antibody

NÄRVARON av brun membraninfärgning ska observeras enligt känd HER2-onkoproteinstatus hos vald positiv kontroll.

## 3. Intern komponent för negativ kontrollvävnad – HER2 Positive Control

FRÄNVARON av membraninfärgning ska observeras. En negativ kontrollvävnadskomponent bekräftar brist på korsreaktivitet i identifieringssystemet för de celler/cellulära komponenter som det har inriktats på. Om membraninfärgning uppstår i en negativ kontrollvävnadskomponent ska resultat med patientpreparat anses vara ogiltiga.

## 4. Patientvävnad – infärgad med HER2 Negative Control

NÄRVARON av membraninfärgning verifierar den specifika märkningen av målantigenen med den primära antikroppen. Annan brun infärgning som uppstår i preparatets cytoplasma som har behandlats med HER2 Negative Control, till exempel bindväv, leukocyter, erythrocyter eller nekrotisk vävnad, ska anses vara icke-specifik bakgrundsinfärgning och ska noteras.

## 5. Patientvävnad – infärgad med HER2 Primary Antibody

Förekomstnivåer av HER2-onkoprotein avgörs av de kriterier som har definierats i både tabell 4 och i Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

## Begränsningar

### A. Allmänna begränsningar

immunohistokemi är en laboratoriebaserad teknik i flera steg som används som hjälp i tolkning och avgörande av histopatologiska egenskaper. Det är en teknik som kräver särskild utbildning i alla aspekter av proceduren (inklusive val av lämpliga reagenser, vävnad, fixering, bearbetning och preparering av IHC-objektglas) och tolkning.

Immunohistokemisk infärgning av vävnad är beroende av hantering, fixering och bearbetning av vävnaden före infärgningen. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, antikropps-TRAP eller falska negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på varierande fixering, inbäddningsmetoder eller på inneboende oregelbundenheter inom vävnaden (15). Överdriven eller ofullständig motinfärgning kan också äventyra korrekt tolkning av resultaten.

Icke-specifik infärgning, om sådan finns, ser oftast diffus ut. Sporadisk infärgning av bindväv kan också observeras i snitt från överdrivet formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av infärgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler infärgas ofta icke-specifikt (16). Falskt positiva resultat kan ses beroende på icke-immunologisk bindning av

proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter) eller endogen peroxidase (cytokrom C), beroende på vilken typ av immunohistokemisk infärgning som har använts.

Vävnader från patienter som har infekterats med hepatit B-virus och som innehåller ytantigen (HBsAg) av hepatit B-virus kan uppvisa icke-specifik infärgning med pepparrotsperoxidas (17). Övriga immunohistokemiska infärgningar eller varierande infärgning kan vara ett resultat av ändringar i förekomstnivåerna av kodade gener eller antigener. Eventuella ändringar i förväntade infärgningsmönster ska tolkas tillsammans med alla andra diagnostiska undersökningar.

Tolkningen av den immunohistokemiska infärgningen ska kompletteras med morfologiska studier och med användning av lämpligt kontrollmaterial, samt utvärderad inom sammanhang av patientens kliniska historik och eventuella diagnostiska test som har utförts av en utbildad patolog.

Prestanda för testet (d.v.s. bedömningar av om både positiva och negativa kontroller är adekvata) och tolkningen av eventuell immunohistokemisk infärgning eller frånvaro av detta måste utföras i ett korrekt godkänt/licensierat laboratorium under övervakning av lämplig och erfaren patolog, som är ansvarig för de översiktliga bedömningen av det immunohistokemiska testet och dess tolkning.

## B. Produktspecifika begränsningar

Denna produkt är inte avsedd för användning i flödescytometri. Prestandaegenskaper har inte bestämts för flödescytometri.

Falska negativa resultat kan uppstå som ett resultat av nedbrytning av antigener i vävnadssnittet. Objektglas som krävs för utvärdering av HER2-onkoprotein och tumörbekräftelse ska förberedas samtidigt. För att bevara antigeniciteten ska vävnadssnitt som har monterats på objektglas i (Leica Biosystems Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides – produktkod 3800040) infärgas inom 4–6 veckor efter snittningen om den utförs vid rumstemperatur (18–24 °C). Vi rekommenderar att objektglaset inkuberas under 12–18 timmar vid 37 °C efter snittningen. De snitt som kräver ytterligare vidhäftning kan inkuberas vid 60 °C under ytterligare en timme.

Minimal naturlig variation av den immunohistokemiska profilen kan ses mellan tillväxtsatser av de cellinjer som används inom Bond Oracle HER2 IHC System. Denna naturliga variation ligger väl inom godtagbara toleransnivåer för en biologisk entitet och påverkar inte tolkningen eller prestanda för systemet.

Karakteriseringen av de cellinjer som använder både flödescytometri och in situ-hybridisering enligt tabell 5 kan också utsättas för naturlig biologisk variation. Teknisk och tolkningsmässig variation av kontrollcellinjer enligt bedömning av fluorescerande in situ-hybridisering har också rapporterats (18).

Vid bedömningen av HER2 Control Slides ska alla relevanta utgångsdatum beaktas. Förvara Bond Oracle HER2 IHC System vid 2–8 °C. Frys inte in. Återför till 2–8 °C direkt efter användning. Avvikelser från dessa villkor gör att testet ogiltigförklaras.

Ersätt inte reagenser som tillhör Bond Oracle HER2 IHC System men några andra komponenter, levererade från Leica Biosystems eller från andra tillverkare. På så sätt kan testet ogiltigförklaras.

Det är viktigt att alla steg som beskrivs i avsnitt C till E (Procedur) utförs i föreskriven ordning. Avvikelser från denna ordning gör att testet ogiltigförklaras.

Det är viktigt att vävnader som bara har fixerats i formalinbaserade fixativ används i testet. Används andra typer av fixativ ogiltigförklaras testet.

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

## Cellinjedata

Cellinje	Bond Oracle HER2 IHC System – profil	HER2 receptorbelast- ning per cell*	HER2 genförstärkningsstatus <sup>†</sup>	
			HER2 kopia- nummer	HER2: Krom. 17 genförhållande
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

<sup>\*</sup>HER2-receptorbelastning, analys enligt bedömning genom flödescytometri. <sup>†</sup>HER2-genförstärkning, status enligt bedömning genom dubbel sond (HER2: Kromosom 17) FISH.

Tabell 5. HER2 Control Slide – profil

## Klinisk konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest

I första delen av studien utforskades lämpligheten av Bond Oracle HER2 IHC System i användning som hjälp i avgörandet av behandling med Herceptin® (trastuzumab)-terapi. Studien var avsedd att undersöka konkordansen mellan Bond Oracle HER2 IHC System och Dako HercepTest, som anses vara "högsta standard" för detta test. Acceptanskriteriet har definierats som mer än 75 % samlad konkordans mellan de två testen med ett konfidensintervall (KI) på 95 %.

Studien utfördes som en USA-baserad utvärdering på två platser och som blindtest. Varje undersökningsplats fick levererat formalinfixerade, paraffinbäddade bröstcancerprov av känd HER2-status. Fallen valdes i omvänd ordningsföljd från kliniska arkiv. De representerar efter varandra följande fall som har inkommit till en histopatologisk avdelning för kliniska test och har testats oberoende av andra prognostiska och/eller prediktiva faktorer, utan att någon partiskhet (bias) har ingått i gruppen. Grupper på 160 och 292 preparat har testats på Plats 1 respektive Plats 2. Varje grupp hade samma representation av osäkra/positiva (2+, 3+) och negativa (0, 1+) fall, baserat på tidigare tilldelade HER2 IHC-poäng, vilket resulterade i en total studiepopulation på 452 prov. Tolv (12) prov ansågs vara olämpliga, på grund av brist på tillräckligt invasiv tumör och togs bort från studien. Ytterligare nio (9) prov kunde inte bedömas eftersom vävnad har lyfts från objektglasytan, vilket resulterade i en slutlig studiepopulation på 431 prov.

Alla fall var infärgade med HercepTest enligt tillverkarens anvisningar på insatsen i paketet. Sekventiella snitt från varje fall infärgades med Bond Oracle HER2 IHC System på det helautomatiserade, avancerade Leica Biosystems' BOND-infärgningssystemet. Alla fall identifierades från sin unika patient-ID-information och medföljdes av kliniska data om tumörstorlek, tumörstadium, tumörgrad och östrogenreceptorstatus.

Alla infärgade objektglas maskerades och poängsattes slumpmässigt av utbildade observatörer på två platser. Vid konkordansanalysen 2x2 tolkades poängen som negativa om infärgningsintensiteten var 0 eller 1+ och positiva för poäng på 2+ eller 3+. Vid konkordansanalys 3x3, tolkades poängen som negativa om infärgningen var 0 eller 1+, osäkra för poäng på 2+ och positiva för poäng på 3+. Data analyserades sedan efter överensstämmelse med positiv infärgning och negativ infärgning.

## 2x2 konkordansresultat

I denna primära analys kategoriseras testresultaten från de två testen (Bond Oracle HER2 IHC System och Dako HercepTest) som negativa (0, 1+) eller positiva (2+, 3+). Frekvenserna för fyra möjliga kombinationer visas i 2x2-tabellformat (se tabell 6). Sedan beräknades den samlade konkordanskvoten baserat på denna 2x2-tabell, medföljt av ett 95 % exakt konfidensintervall (baserat på binomialfördelning).

Nollhypotesen ( $H_0$ ), som framgångskriterier jämförs med, är att konkordansen inte är större än 75 %. Den observerade överensstämmelsen för 431 prov mellan de två testen i en 2x2-analys visar en konkordans på 92,34 % (398/431) med ett 95 % KI på 89,42 % - 94,67 %. Dessa data stödjer avvisandet av nollhypotesen ( $H_0$ ) att överensstämmelsen inte var större än 75 % med ett p-värde på <0,0001.

Procentandelen för positiv överensstämmelse (sensitivitet) eller abiliteten för Bond Oracle HER2 IHC System att korrekt identifiera positiva fall i HercepTest (procentandel positivt poängsatta prov av både Bond Oracle HER2 IHC System och HercepTest av alla positiva fall i HercepTest) var 84,87 % (129/152) med ett 95 % KI på 78,17 % - 90,16 %. Procentandelen för negativ överensstämmelse (specificitet) eller abiliteten för testet att korrekt identifiera negativa fall i HercepTest (procentandelen prov som har poängsatts negativa av både Bond Oracle HER2 IHC System och HercepTest av alla negativa fall i HercepTest) var 96,42 % (269/279) med ett 95 % KI på 93,51 % - 98,27 %.

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

2x2-konkordans (95 % KI) = 92,34 % (89,42 till 94,67 %); p <0,0001

Tabell 6. 2x2-konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System med HercepTest

## 3x3 konkordansresultat

Data har grupperats som negativa (0 eller 1+), osäkra (2+) eller positiva (3+) för 3x3-analys och har visat en konkordans på 86,54 % (373/431) med ett 95 % KI på 82,95 % till 89,62 %. Därför avvisades nollhypotesen ( $H_0$ ) att överensstämmelsen inte var större än 75 %, med ett p-värde på <0,0001.

Procentandelen positiv överensstämmelse för 3+ (procentandel prov poängsatta som positiva 3+ av både Bond Oracle HER2 IHC System och HercepTest av alla positiva fall med 3+ i HercepTest) i studien var 73,33 % (66/90) med ett 95 % KI på 62,97 % till 82,11 %. Procentandelen negativ överensstämmelse var 96,42 % (269/279) med ett 95 % KI på 93,51 % till 98,27. Se tabell 7.

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

3x3-konkordans (95 % KI) = 86,54 % (82,95 % till 89,62 %); p <0,0001

Tabell 7. 3x3-konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System med HercepTest

Sammanfattningsvis visar data som har genererats i denna studie att Bond Oracle HER2 IHC

System kan användas som hjälp i avgörandet av behandling för Herceptin® (trastuzumab)-terapi, baserat på dess höga konkordans med HercepTest.

## Klinisk konkordans för Bond Oracle HER2 IHC System jämfört med PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Andra delen av studien var avsedd att undersöka konkordansen mellan Bond Oracle HER2 IHC System och Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, avsedd som "högsta standard" vad gäller reflexivt test för genbedömning som används tillsammans med HER2-immunohistokemi.

Studien utfördes vid samma undersökningsplatser och använde samma studiegrupp som i del 1. Alla fall infärgades med Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit enligt tillverkarens anvisningar på insatsen i paketet. Sekventiella snitt från varje fall infärgades med Bond Oracle HER2 IHC System på det helautomatiska, avancerade BOND-infärgningssystemet (från del 1 av den kliniska studien). Av de 431 infärgade fallen erhöles inga resultat från tre tillfällen på grund av otillräcklig sondhybridisering vilket gav en totalgrupp på 428 fall.

Alla infärgade objektglas poängsattes av utbildade observatörer på två undersökningsplatser. Poängen tolkades som negativa för 3x2-konkordansanalysen om HER2/CEP17-genförstärkningskvoten var lägre än (<) 2,0 och positiva om den var större än eller lika med (>) 2,0 efter ett antal på 20 tumörceller.

### 3x2 konkordansresultat

Den observerade överensstämmelsen för 428 prov mellan de två testen i en 3x2-analys visar en konkordans på 87,6 % (375/428) med ett 95 % KI på 84 % 90 %.

Procentandelen för positiv överensstämmelse (sensitivitet) eller abiliteten för Bond Oracle HER2 IHC System att korrekt identifiera positiva fall i PathVysion (procentandel positivt poängsatta prov av både Bond Oracle HER2 IHC System och PathVysion av alla positiva fall i PathVysion) var 93,8 % (61+30/97) med ett 95 % KI på 86,8 % till 97,4 %.

Procentandelen för negativ överensstämmelse (specificitet) eller abiliteten för testet att korrekt identifiera negativa fall i PathVysion (procentandelen prov som har bedömts negativa av både Bond Oracle HER2 IHC System och PathVysion av alla negativa fall i PathVysion) var 85,8 % (284/331) med ett 95 % KI på 81,6 % till 89,2 %. Se tabell 8.

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

Samlad konkordans (95% KI) = 87,6 % (84 till 90 %)

Tabell 8. 3x2-konkordans för infärgning med Bond Oracle HER2 IHC System jämfört med PathVysion HER-2 DNA Probe kit.



## Immunoreaktivitet – normal panel

Normal vävnadstyp	Infärgningsmönster	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Binjure	Negativ	Negativ
Hjärna, cerebellum	Negativ	Negativ
Hjärna, cerebrum	Negativ	Negativ
Bröst	Negativ	Negativ
Benmärg	Negativ	Negativ
Tjocktarm	Negativ	Negativ
Matstrupe	Negativ	Negativ
Öga	Negativ	Negativ
Hypofys	Moderat cytoplasmisk infärgning observerad i hypofysceller (1/3)	Negativ
Njure	Negativ	Negativ
Struphuvud	Negativ	Negativ
Lever	Negativ	Negativ
Lunga	Negativ	Negativ
Mesotel	Negativ	Negativ
Äggstock	Negativ	Negativ
Bukspottkörtel	Negativ	Negativ
Bisköldkörtel	Negativ	Negativ
Perifer nerv	Negativ	Negativ
Prostata	Negativ	Negativ
Spottkörtel	Negativ	Negativ
Hud	Negativ	Negativ
Tunntarm	Negativ	Negativ
Mjälte	Negativ	Negativ
Mage	Svag cytoplasmisk infärgning observerad i magkörtlarna (2/3)	Negativ
Tvärstrimmig muskel	Negativ	Negativ
Testikel	Negativ	Negativ
Tymus	Negativ	Negativ
Sköldkörtel	Negativ	Negativ
Tonsill	Negativ	Negativ
Livmoderhals	Negativ	Negativ
Livmoder	Negativ	Negativ

Tabell 9. Normal panel för infärgning

## Reproducerbarhetsstudie

### Inom och mellan precisionstest

Precisionstest utfördes hos Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Den vävnad som användes var formalinfixerad, paraffinbäddad komposit TMA (tissue micro array) från Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), som 18 av 4 mm diameters vävnadsbiopsier från invasivt bröstcancerom. De 20 fallen valdes baserat på tidigare tilldelade HER2-poäng. På denna grund inkluderades x5 fall av HER2 3+, x5 fall av HER2 2+, x5 fall av HER2 1+ och x5 fall av HER2 0.

#### A. Precisionstest inom körning

Precisionstest inom körning för Bond Oracle HER2 IHC System utvärderades på totalt 40 på varandra följande snitt från en TMA med 20 invasiva brösttumörer och 40 HER2 Control Slides. Alla objektglas var infärgade med Bond Oracle HER2 IHC System på det helautomatiska avancerade BOND-infärgningssystemet. Snitten färgades in under en kontinuerlig period med ett Bond Oracle HER2 IHC System från samma tillverkningsplats. Infärgade snitt avidentifierades och bedömdes slumpmässigt av en enda erfaren observatör för att avgöra precision inom körning.

En utvärdering av objektglas från undersökningen "inom körning" indikerade att 733/800 (91,63 %) testdatapunkter kunde tolkas. 40 datapunkter exkluderades på grund av närvaro av endast DCIS och ytterligare 27 datapunkter kunde inte tolkas på grund av förlust av invasiv tumör (specifikt för tre biopsier). Variation i infärgning uppstod i 61 (8,32 %) av möjliga 733 infärgningshändelser. Vid 37 tillfällen observerades variation från 3+ till 2+ (n = 20) och från 1+ till 0 (n = 17) och kunde därför inte representera en ändring från kliniskt positiv till kliniskt negativ eller vice versa i en 2x2-databedömning. Återstående 24 (3,27 %) tillfällen representerade en ändring från kliniskt negativ (0 eller 1+) till kliniskt positiv (2+ eller 3+). Godkänt värde = 96,7 % (95 % KI = 95,15 % till 97,81 %).

#### B. Precisionstest mellan körningar

Precisionstest mellan körningar för Bond Oracle HER2 IHC System utvärderades på totalt 24 på varandra följande snitt från en TMA med 20 invasiva brösttumörer och 24 HER2 Control Slides. Alla objektglas var infärgade med Bond Oracle HER2 IHC System på det helautomatiska avancerade BOND-infärgningssystemet. Objektglasen utvärderades under 8 oberoende körningar, utförda inom samma laboratorium, vid tre separata tillfällen med ett Bond Oracle HER2 IHC System från samma tillverkningsplats. Infärgade objektglas avidentifierades och bedömdes slumpmässigt av en enda erfaren observatör för att avgöra precision mellan körningar.

En utvärdering av objektglas från undersökningen "mellan körningar" indikerade att 456/480 (95,00 %) testdatapunkter kunde tolkas. 24 datapunkter kunde inte tolkas på grund av förlust av invasiv tumör (specifikt för 5 biopsier). Variation i infärgning uppstod i 42 (9,21 %) av möjliga 456 datapunkter. Vid 30 tillfällen observerades variation från 3+ till 2+ (n = 10) och från 1+ till 0 (n = 20) och kunde därför inte representera en ändring från kliniskt positiv till kliniskt negativ eller vice versa i en 2x2-databedömning. Återstående 12 (2,63 %) representerade en ändring från kliniskt negativ (0 eller 1+) till kliniskt positiv (2+ eller 3+). Godkänt värde = 97,37 % (95 % KI = 95,90 % till 98,77 %).

#### C. Reproducerbarhet från parti till parti

Vid avgörande av reproducerbarhet från parti till parti tillverkades 3 partier av Bond Oracle HER2 IHC System under GMP vid tre separata tillfällen och utvärderades på 24 brösttumörnsnitt (24 testdatapunkter) tagna från fyra olika formalinfixerad, paraffinbäddad vävnadssegment (representerande 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-infärgningsintensiteter) och tre HER2 Control Slides (12 kontrolldatapunkter). Tre oberoende körningar utfördes inom samma laboratorium vid tre separata tillfällen, var och en med ett separat tillverkningsparti av Bond Oracle HER2 IHC System. Alla objektglas var infärgade med Bond Oracle HER2 IHC

System på det helautomatiska avancerade BOND-infärgningssystemet. Infärgade objektglas maskerades och bedömdes slumpmässigt av en enda utbildad observatör för att avgöra reproducerbarhet från parti till parti.

En utvärdering av objektglas (test och kontroller) från undersökningen mellan partier indikerade att 36/36 datapunkter kunde tolkas. Ingen variation i infärgning uppstod i de 36 datapunkterna mellan de tre olika tillverkningspartierna av Bond Oracle HER2 IHC System. Infärgning med Bond Oracle HER2 IHC System är konsekvent för alla tillverkningssatser.

## D. Reproducerbarhet mellan laboratorier

Test av reproducerbarhet mellan laboratorier av Bond Oracle HER2 IHC System utvärderades på tre platser, Leica Biosystems Newcastle Ltd (plats A) och två oberoende laboratorier (plats B och C) på totalt 192 snitt från ett TMA med 20 invasiva brösttumörer och 24 HER2 Control Slides. Av de 192 infärgade TMA-snitten var 96 infärgade med HER2 Primary Antibody och 96 med reagensen HER2 Negative Control. Alla objektglas var infärgade med Bond Oracle HER2 IHC System på det helautomatiserade, avancerade BOND-infärgningssystemet. Objektglasen utvärderades under 8 oberoende körningar, utförda inom vart och ett av de tre olika undersökningsplatserna med ett Bond Oracle HER2 IHC System från samma tillverkningsatts. Infärgade objektglas avidentifierades och bedömdes slumpmässigt av en enda erfaren observatör hos Leica Biosystems, Newcastle Ltd för att avgöra reproducerbarhet mellan laboratorier.

En utvärdering av objektglas från undersökningen av reproducerbarhet mellan laboratorier indikerade att 1477/1920 (76,93 %) testdatapunkter kunde tolkas. 443 testdatapunkter kunde inte tolkas på grund av:

- Inadekvata prestanda hos HER2 Control slide vid 2/24 tillfällen, vilket resulterade i att 2 körningar/160 testdatapunkter togs bort. Händelsen inträffade en gång på plats A och en gång på plats B (80 datatestpunkter per borttagen undersökningsplats).
- Avvikelse från testplanen på plats C, där 24 objektglas totalt motinfärgades manuellt med hematoxylin efter infärgning med Bond Oracle HER2 IHC System. Detta resulterade i överdriven motinfärgning av både HER2 control slides och TMA-testdatapunkter så att 240 datapunkter togs bort.
- Förlust av invasiv tumör vilket resulterade i att 23 testdatapunkter togs bort. Händelsen inträffade vid 23 tillfällen på plats A och var ett direkt resultat av vävnadsförlust i TMA-segmentet vid produktion av de 192 på varandra följande TMA-snitt som krävs för att slutföra undersökningen.
- Ej tolkningsbar infärgning på grund av otillräcklig rengöring av det helautomatiserade, avancerade BOND-infärgningssystemet vilket resulterade i att 20 datapunkter togs bort.

En utvärdering av de tolkningsbara objektglasen i undersökningen av precision mellan laboratorier indikerar att variation i infärgning uppstod i 79 (5,28 %) av möjliga 1 477 infärgningshändelser. Av dessa representerade 14/1477 (0,95 %) tillfällen variationer från 0 till 1+ eller 2+ till 3+ och som sådana motsvarade inte en ändring från kliniskt positiv till kliniskt negativ eller vice versa i en 2x2-databedömning. Godkänt värde = 99,05 % (95 % KI = 98,42 % till 99,46 %). Av de 14 infärgningshändelserna inträffade 5/1477 (0,34 %) hos Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (plats A), 8/1477 (0,54 %) på plats B och 1/1477 (0,07 %) på plats C.

De återstående 65/1477 (4,40 %) infärgningshändelserna visade en variation från 2+ till 1+ eller 2+ till 0 och skulle därför motsvara en ändring från kliniskt positiv till kliniskt negativ eller vice versa i en 2x2-databedömning. Godkänt värde = 95,6 % (95 % KI = 94,42 % till 96,54 %). Av de 65 kliniskt signifikanta ändringarna inträffade 11/65 (16,9 %) hos Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (plats A), 24/65 (36,9 %) på plats B och 30/65 (46,1 %) på plats C. Inte under något av tillfällena av de kliniskt signifikanta ändringar ändrades ett resultat med 3+ till en negativt (0 eller 1+) eller vice versa.

## E. Reproducerbarhet mellan observatörer

40 slumpmässigt valda fall med invasiv bröstcancer med jämn fördelning av varje HER2 IHC-grad (resektionspreparat) snittades i följd och tillhandahölls Leica Biosystems, Newcastle Ltd (plats A), plats B och plats C för infärgning och tolkning. Snitten avidentifierades och slumpades vid varje plats före poängsättning. Överensstämmelse mellan observatörer mellan två oberoende klinikplatser, plats B och plats C, var 87,5 % (95 % KI = 73,3 % till 95,8 %). Överensstämmelsen mellan plats B och C och Leica Biosystems Newcastle, Ltd var 92,5 % (95% KI = 79,6 % till 98,4 %) och 85 % (95 % KI = 70,1 % till 94,29 %) respektive. Analysen av den totala samstämmigheten mellan de tre observatörerna (A, B, C) är 82,50 %.

## F. Precision mellan instrument (BOND-MAX v BOND-III)

Precisionstest mellan instrument med Bond Oracle HER2 IHC System utfördes vid en enda oberoende europeisk undersökningsplats. De prov som testades erhöles från formalinfixerade, paraffinbäddade hela snitt från etthundrettio åtta (138) fall av invasiv bröstcancer (nålbiopsi- och resektionspreparat). Test mellan instrument utfördes prospektivt inom undersökningsplatsen med infärgning av på varandra följande snitt på plattformarna BOND-MAX och BOND-III. Tre (3) fall ansågs vara inte lämpliga på grund av borttagen prov-/tumörtillgänglighet från studien.

Identiska partinummer i Bond Oracle HER2 IHC System och hjälpreagenser för BOND-instrument användes för alla instrument. Sektioner färgades i efterhand. Objektglasen tolkades på undersökningsplatsen av en enda erfaren observatör för att avgöra precisionen mellan instrumenten.

En utvärdering av objektglasen vad gäller precision mellan instrument visade en 2x2-konkordans mellan positiva (2+, 3+) och negativa (0, 1+) på 94,2 % (130/138) med ett 95 % KI på 88,9 till 97,5 % och en 3x3-konkordans mellan positiva (3+), osäkra (2+) och negativa (0, 1+), konkordans på 87,0 % (120/138) med ett 95 % KI på 80,2 till 92,1 %.

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

Samlad konkordans (95 % KI) = 94,2 % (88,9 till 97,5 %)

Tabell 10. 2x2-konkordans för infärgning med Bond Oracle HER2 IHC System på plattformarna BOND-MAX jämfört med BOND-III.

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

Samlad konkordans (95 % KI) = 87,0 % (80,2 till 92,1 %)

Tabell 11. 3x3-konkordans för infärgning med Bond Oracle HER2 IHC System på plattformarna BOND-MAX jämfört med BOND-III.

Sammanfattningsvis visar de data som har genererats i denna studie en hög nivå av konkordans mellan systemen Leica Biosystems' BOND-MAX och BOND-III när de utvärderades med Bond Oracle HER2 IHC System.

## Felsökning

Problem	Möjlig orsak	Åtgärd
Immunohistokemisk infärgning saknas	Körning avbruten i förväg	Använd BOND-programmet och kontrollera om det har uppstått fel under infärgningen som kan rapporteras och åtgärda dem enligt anvisningarna i BOND-programmet.
	Felaktigt val av protokoll	Kontrollera lämplig standard för <b>*IHC Protocol H</b> i fältet för infärgningsprotokoll i dialogrutan Add slide.
	Otillräcklig avparaffinering av objektglas	Kontrollera att läget <b>*Dewax</b> har valts i fältet Preparation i dialogrutan Add slide.
	Olämpliga bulkreagenser har fördelats	Se till att alla BOND-reagenser har fördelats i lämpliga bulkbehållare och att de har placerats i lämpliga positioner på instrumentet.
	Kontaminering av BOND Wash Solution med natriumazid	Använd ny BOND Wash Solution som har preparerats till lämplig styrka.
Svag specifik immunohistokemisk infärgning	Olämplig hämtning av epitop	Kontrollera att lämpliga BOND Epitope Retrieval-reagenser har fördelats till korrekta bulkbehållare och att BOND-programmet är standardinställt på lämpligt protokoll för epitophämtning, <b>*HIER 25 min with *ER1 (97)</b> .
	Olämplig fixering eller bearbetning av testpreparat	Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas.
	Bond Oracle HER2 IHC System används efter sitt utgångsdatum	Kontrollera att utgångsdatumet för det Bond Oracle HER2 IHC System som används inte har förfallit.
Överdriven specifik immunohistokemisk infärgning	Olämplig hämtning av epitop	Kontrollera att lämpliga BOND Epitope Retrieval-reagenser har fördelats till lämpliga bulkbehållare och att BOND-programmet har standardinställts på <b>*HIER 25 min with ER1 (97)</b> .
	Fixeringen varierar	Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas. Testa fallet igen med ett annat segment, om så är möjligt. Om det inte går bedöms de ytor som uppvisar bäst fixeringsmönster tillsammans med ett motsvarande H&E-infärgat snitt.

Problem	Möjlig orsak	Åtgärd
Icke-specifik bakgrundsfärgning	Olämpliga bulkreagenser har fördelats	Se till att alla BOND-reagenser har fördelats i lämpliga bulkbehållare och att de har placerats i lämpliga positioner på instrumentet.
	Otillräcklig avparaffinering av objektglas	Kontrollera att <b>*Dewax</b> har valts i fältet Preparation i dialogrutan Add slide.
	Icke-specifik immunohistokemisk korsreaktion i vävnad	Information finns i Bond Oracle HER2 IHC System, beskrivningen av normal korsreaktivitet för vävnad (se tabell 9).
	Icke-specifik immunohistokemisk korsreaktion med ytor av vävnadsnekros	Kontrollera att ett formalinbaserat fixativ används och att bearbetningsschemana är lämpliga för preparat som testas. Testa fallet igen med ett annat segment, om så är möjligt. Om det inte går bedöms de ytor som uppvisar bäst fixeringsmönster tillsammans med ett motsvarande H&E-infärgat snitt.
	Torkande artefakt efter färdigställande av en infärgningskörning	Om objektglaset ska placera i körning över natten rekommenderar vi att BONDS funktioner med fördröjd start används. Kontrollera att det finns tillräcklig volym destillerat eller avjoniserat vatten att fördela på objektglaset under denna period så att objektglaset inte uttorkas.
	Snitt har fastnat på objektglas med hjälp av stärksetillsatser	Använd objektglas utan stärkelse (Leica Biosystems Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides – produktkod 3800040).
Vävnad har lossnat från patient-/kontrollobjektglas	Felaktig typ av objektglas har använts eller snittet har inte dränerats tillräckligt	Kontrollera att lämpliga objektglas används för patient-/kontrollsnitt (Leica Biosystems Plus Slides – produktkod S21.2113 eller Apex BOND Slides – produktkod 3800040) Se till att objektglaset dräneras tillräckligt och att de inkuberas under 12–18 timmar vid 37 °C (över natten). De snitt som kräver ytterligare vidhäftning kan inkuberas vid 60 °C under ytterligare en timme.

Tabell 12. Bond Oracle HER2 IHC System Trouble Shooting Guide.

Om det uppstår problem med Bond Oracle HER2 IHC System som inte behandlas i felsökningsanvisningarna (tabell 12) kontaktar du en lokal servicetekniker hos eller återförsäljare av Leica Biosystems för att få hjälp.

## Referenser

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
11. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990; 17: 234-247.
12. 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
13. 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: 836-43.
14. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62.
15. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
16. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry*, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
17. 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.
18. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.











## Ändringar jämfört med tidigare utgåva

Komponenter som ingår, Identifiering av symboler.

## Utgivningsdatum

16 juli 2020

## Identifiering av symboler

	Satskod		Förvaring		Katalognummer
	Medicinsk enhet för in vitro-diagnostik		Tillverkare		Bräcklig
	eIFU - läs användningsanvisningarna		Räcker till <n> test		Använd senast ÅÅÅÅ-MM-DD
<b>SN</b>	Serienummer		Endast recept		

HercepTest™ är ett varumärke som tillhör licenser som ägs av DakoCytomation, Denmark A/S  
 Herceptin® är ett varumärke som tillhör Genentech, Inc. och F. Hoffmann-La Roche Ltd.