

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

Code GM333

2nd edition/ 2ème édition/ 2. Auflage

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is a direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay designed to quantitatively determine *HER2* gene amplification in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tissue specimens and FFPE specimens from patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is indicated in adjuction to HercepTest™ in the assessment of patients for whom Herceptin™ treatment is being considered.

The vial contains reagent sufficient for 20 tests.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est un test d'hybridation in situ en fluorescence directe (FISH) conçu pour la détermination quantitative de l'amplification du gène *HER2* dans des échantillons tissulaires de cancer du sein inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE) et dans des échantillons FFPE de patients atteints d'adénocarcinome métastatique de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est indiqué en supplément du test HercepTest™ pour l'évaluation des patients chez lesquels un traitement par Herceptin™ est envisagé.

Le flacon contient les réactifs nécessaires pour 20 tests.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist ein In-situ-Hybridisierungsassay unter direkter Fluoreszenz (FISH) für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Brustkrebsgewebeprobe und FFPE-Proben von Patienten mit metastatischem gastrischem Adenokarzinom oder Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist als Ergänzung zum HercepTest™ für die Bewertung von Patientinnen indiziert, für die eine Behandlung mit Herceptin™ in Erwägung gezogen wird.

Die Reagenzmenge im Behälter ist für 20 Tests ausreichend.

Accessory reagents to be used together with *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) /
Réactifs accessoires à utiliser conjointement avec *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) /
Zusatzreagenzien, die mit *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) zu verwenden sind:

Code/ Réf/ Code-Nr.	Product name/ Nom du produit/ Produktbezeichnung
GM300	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)
GM301	ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)
GM302	ISH Pepsin (Dako Omnis)
GM303	ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)
GM304	Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Contents/ Table des matières/

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use.....	5
Summary and Explanation - Breast.....	6
Principle of Procedure - Breast.....	6
Reagents - Breast.....	7
Precautions - Breast.....	8
Storage - Breast.....	8
Specimen Preparation - Breast.....	9
INSTRUCTIONS FOR USE - Breast.....	10
A. Reagent Preparation - Breast.....	10
B. Staining Procedure - Breast.....	11
Quality Control - Breast.....	13
Interpretation of Staining - Breast.....	13
Limitations - Breast.....	15
Performance Characteristics – Breast.....	15
Troubleshooting - Breast.....	23
Appendix 1 - Breast.....	25
Appendix 2 - Breast.....	27
Summary and Explanation - Gastric.....	28
Principle of Procedure - Gastric.....	28
Reagents - Gastric.....	29
Precautions - Gastric.....	30
Storage - Gastric.....	31
Specimen Preparation - Gastric.....	31
INSTRUCTIONS FOR USE - Gastric.....	32
A. Reagent Preparation - Gastric.....	32
B. Staining Procedure - Gastric.....	34
Quality Control - Gastric.....	35
Interpretation of Staining - Gastric.....	37
Limitations - Gastric.....	39
Performance Characteristics - Gastric.....	39
Troubleshooting - Gastric.....	47
Appendix 3 - Gastric.....	49
Appendix 4 - Gastric.....	50
Appendix 5 - Gastric.....	51
References.....	157
Explanation of symbols.....	159

FRANÇAIS

Utilisation prévue	52
Résumé et explication – Sein	53
Principe de la procédure - Sein	53
Réactifs - Sein.....	54
Précautions - Sein.....	55
Conservation - Sein.....	56
Préparation des échantillons - Sein.....	57
INSTRUCTIONS D'UTILISATION - Sein	57
A. Préparation des réactifs - Sein.....	57
B. Procédure de coloration – Sein.....	59
Contrôle de qualité - Sein.....	61
Interprétation de la coloration - Sein.....	61
Limites - Sein	63
Performances – Sein.....	63
Dépannage - Sein	73
Annexe 1 - Sein	75
Annexe 2 - Sein	77
Résumé et explication – Estomac	78
Principe de la procédure – Estomac.....	78
Réactifs – Estomac	79
Précautions d'emploi – Estomac	80
Conservation – Estomac	82
Préparation des échantillons – Estomac	82
INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Estomac	83
A. Préparation des réactifs – Estomac	83
B. Procédure de coloration – Estomac.....	85
Contrôle de qualité – Estomac	87
Interprétation de la coloration – Estomac	87
Limites – Estomac.....	90
Performances – Estomac.....	90
Dépannage – Estomac.....	99
Annexe 3 – Estomac	101
Annexe 4 – Estomac.....	102
Annexe 5 – Estomac.....	103
Bibliographie	157
Explication des symboles.....	159

DEUTSCH

Verwendungszweck	105
Zusammenfassung und Erläuterung – Brustkrebs.....	106
Prinzip des Testverfahrens – Brustkrebs.....	106
Reagenzien – Brustkrebs	107
Vorsichtsmaßnahmen – Brustkrebs	108
Lagerung – Brustkrebs.....	109
Gewebevorbereitung – Brustkrebs	109
GEBRAUCHSANWEISUNG – Brustkrebs.....	110
A. Vorbereitung der Reagenzien – Brustkrebs	110
B. Färbeverfahren – Brustkrebs	112
Qualitätskontrolle – Brustkrebs	113
Interpretation des Anfärbens – Brustkrebs	114
Beschränkungen – Brustkrebs	116
Leistungseigenschaften – Brustkrebs.....	116
Fehlerbehandlung – Brustkrebs	126
Anhang 1 – Brustkrebs.....	128
Anhang 2 – Brustkrebs.....	130
Zusammenfassung und Erläuterung – Magenkrebs	131
Prinzip des Testverfahrens – Magenkrebs	131
Reagenzien – Magenkrebs	132
Vorsichtsmaßnahmen – Magenkrebs	133
Aufbewahrung – Magenkrebs	135
Probenvorbereitung – Magenkrebs	135
GEBRAUCHSANWEISUNG – Magenkrebs	136
A. Vorbereitung der Reagenzien – Magenkrebs.....	136
B. Färbeverfahren – Magenkrebs.....	138
Qualitätskontrolle – Magenkrebs	140
Interpretation des Anfärbens – Magenkrebs.....	140
Beschränkungen – Magenkrebs.....	143
Leistungseigenschaften – Magenkrebs	143
Fehlerbehandlung – Magenkrebs.....	152
Anhang 3 – Magenkrebs	154
Anhang 4 – Magenkrebs	155
Anhang 5 – Magenkrebs	156
Literaturnachweise.....	157
Erläuterung der Symbole.....	159

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is the hybridization probe for the automated direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay onboard Dako Omnis instruments and is, together with accessory reagent devices, designed to quantitatively determine *HER2* gene amplification in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tissue specimens and FFPE specimens from patients with adenocarcinoma of the stomach including gastro-esophageal junction.

HER2 IQFISH pharmDx™ is indicated in adjunction to HercepTest™ in the assessment of patients for whom Herceptin™ (trastuzumab) treatment is being considered (see Herceptin™ package insert).

For breast cancer patients, results from *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) are intended for use as an adjunct to the clinicopathologic information currently used for estimating prognosis in stage II, node-positive breast cancer patients.

Gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma is also referred to as gastric cancer in this document.

For breast cancer application, please refer to pages 6-27.

For gastric cancer application, please refer to pages 28-51.

Important: Please note differences for breast cancer tissue and gastric cancer tissue especially in the Interpretation of Staining Sections.

Summary and Explanation - Breast

The human *HER2* gene (also known as *ERBB2* or *NEU*) is located on chromosome 17 and encodes the HER2 protein or p185^{HER2}. The HER2 protein is a membrane receptor tyrosine kinase with homology to the epidermal growth factor receptor (EGFR or HER1) (1-2). The *HER2* gene is present in two copies in all normal diploid cells.

In a fraction of patients with breast cancer, the *HER2* gene is amplified as part of the process of malignant transformation and tumor progression (3-8). *HER2* gene amplification generally leads to overexpression of the HER2 protein on the surface of breast cancer cells (9).

Amplification of the *HER2* gene and/or overexpression of its protein have been demonstrated in 20-25% of breast cancers (10). This up-regulation is associated with poor prognosis, increased risk of recurrence, and shortened survival. Several studies have shown that HER2 status correlates with sensitivity or resistance to certain chemotherapy regimens (11).

Demonstration of high *HER2* protein overexpression or *HER2* gene amplification is essential for initiating therapy with Herceptin™, a monoclonal antibody to HER2 protein. Clinical studies have shown that patients whose tumors have high HER2 protein overexpression and/or amplification of the *HER2* gene benefit most from Herceptin™ (12).

This product (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)) is an IQISH probe mix for automated direct FISH - detecting *HER2* gene amplification. This product should be used together with the specified accessory reagents onboard Dako Omnis and is derived from the manually performed *HER2* gene amplification assay, *HER2* IQFISH pharmDx™, Code K5731.

Principle of Procedure - Breast

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is an IQISH probe mix consisting of a mixture of Texas Red-labeled DNA probes covering a 218 kb region including the *HER2* gene on chromosome 17 and a mixture of fluorescein-labeled peptide nucleic acid (PNA) (13) probes targeting the centromeric region of chromosome 17 (CEN-17). The specific hybridization to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each *HER2* gene locus and a distinct green fluorescent signal at each chromosome 17 centromere.

HER2 gene amplification assessment using the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), is a fully automated method on the Dako Omnis instrument. Three different validated *HER2* FISH staining protocols can be selected in the Dako Link Omnis Workstation software. The protocols differ only in pepsin digestion time, consequently pepsin digestion for 10 min (the Short protocol), 15 minutes (the Medium protocol) or 20 minutes (the Long protocol) can be chosen (see more below). The Medium protocol is recommended for initial analysis.

After staining onboard Dako Omnis the specimens are mounted with Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and coverslipped. Using a fluorescence microscope equipped with appropriate filters (see Appendix 2), tumor cells are located, and enumeration of the red (*HER2*) and green (CEN-17) signals is conducted. Then the *HER2*/CEN-17 ratio is calculated. Normal cells in the analyzed tissue section will serve as an internal positive staining control.

For details see the Interpretation of Staining section.

Please consult the Dako Omnis User Guide(s) for detailed instructions on loading and unloading of slides, ISH Lids (Dako Omnis), reagents, bulk fluids and waste.

Reagents - Breast

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and accessory reagents can be ordered separately as single reagents.

Materials provided

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis): 1.6 mL, ready-to-use, mix of Texas Red-labeled *HER2* DNA probes and fluorescein-labeled CEN-17 PNA probes, supplied in IQISH hybridization buffer. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is shipped on dry ice. **To ensure that the reagent has not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.** Reagent vials, with thawed content, should be stored and handled in an upright position at all times.

The reagent vial contains a gold-coated metal ball that enables reagent mixing using the Dako Omnis Mixing Device (see Dako Omnis Mixing Device User Guide). It is important that the reagent is thoroughly mixed before loading onto Dako Omnis.

Materials required but not provided

Accessory reagents

The following reagents are needed onboard the Dako Omnis instrument for performing *HER2* gene amplification analysis with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis):

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, concentrated 20x; to be diluted 1:20 in a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle (Code GC109). The product contains an antimicrobial agent and an inert green color for easy identification and user-friendliness.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL of 96% ethanol (ready-to-use).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL Pepsin A solution (ready-to-use), pH 2.0; contains stabilizer and an antimicrobial agent. Pepsin is shipped on dry ice. **To ensure that the reagent has not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.**

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis): 175 mL saline-sodium citrate buffer concentrated 20x; to be diluted 1:20 in a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle (Code GC109). The product contains an antimicrobial agent, a detergent and an inert yellow color for easy identification and user-friendliness.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0.8 mL fluorescence mounting medium (ready-to-use) with DAPI.

Although the above reagents are not provided with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), they are briefly described below. Please consult the Instructions For Use for each device for further information.

Additional reagents and devices

Dako Omnis, Code GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), Code GC807

Clarify™, Code GC810

Dako Omnis Mixing Device, Code GC116

ISH Lid, Code GC102

ISH Cleaning Solution, Code GC207

Glass coverslips for mounting (24 mm x 50 mm)

Please consult Dako Omnis Basic and Advanced User Guides for use of additional reagents and devices.

Microscope equipment and accessories

Filters for fluorescence microscope: DAPI and FITC/Texas Red double filter, or FITC and Texas Red mono filters - see Appendix 2 for details. Use of DAPI filter at high magnification negatively affects signal intensity. Long exposure times should be avoided.

Fluorescence microscope with a 100 watt mercury lamp as light source should be used. Other light sources are not recommended with these filters.

Microscope slide folder (cardboard tray for 20 slides with hinged cover or similar).

Precautions - Breast

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) contains ≥10- <25% ethylene carbonate and ≥3- <5% sodium chloride. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is labeled:



Warning

H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear eye or face protection.
P264	Wash hands thoroughly after handling.
P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product.

Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet for additional information.

4. Tissue specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and should be disposed of with proper precautions (14). Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
5. Minimize microbial contamination of reagent to avoid erroneous results.
6. Tissue fixation methods and thickness of specimen other than those specified may affect tissue morphology and/or signal intensity.
7. The reagent has been optimally diluted. Further dilution may result in loss of performance.
8. Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin. Please consult the Safety Data Sheet (SDS) for additional information.
9. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage - Breast

Store the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) <-18 °C (-18 °C to -25 °C is recommended) in the dark. Keep the thawed reagent vial in an upright position at all times. Freezing and thawing the reagent for up to 10 times does not affect performance. Do not leave this component at room temperature.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and the accessory reagents: ISH pepsin (Dako Omnis) and Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) may be affected adversely if exposed to heat. Do not leave these components at room temperature.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and the accessory reagent Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store these components or perform analysis in strong light, such as direct sunlight.

Store the accessory reagents ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) and Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) in the dark at 2-8 °C. Store ISH Pepsin (Dako Omnis) at -18-8 °C. The vial cap, including the flip top cap, should be closed for all reagents during storage.

Diluted solutions (ISH Stringent Wash Buffer working solution and ISH Pre-Treatment Solution working solution) may be stored at 2-8 °C for 30 days.

Do not use any reagents after the expiration date stamped on the reagent container. During storage the reagent cap, including the flip top cap, should be closed. If reagents are stored under conditions other than those specified, the user must validate reagent performance (15).

There are no obvious signs indicating instability of this product. Therefore, it is important to evaluate normal cells in the analyzed tissue section. If an unexpected fluorescence pattern is observed which cannot be explained, and a problem with the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) or its accessory reagents is suspected, please contact Dako Technical Services

Stability onboard the Dako Omnis instrument

Onboard stability of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and of the accessory reagents ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) and ISH Pepsin (Dako Omnis) is 80 hours. Onboard stability of diluted ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) and ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) is 7 days. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software. The use of expired reagents will result in a warning by the Dako Omnis instrument; all slides stained with the expired reagent will change state to 'suspicious' and the slide log on the Workstation will show that an expired reagent has been used.

Specimen Preparation - Breast

Specimens from biopsies, excisions or resections must be handled to preserve the tissue for FISH analysis. Standard methods of tissue processing for immunocytochemical staining should be used for all specimens (16).

Paraffin-embedded sections

Only tissue preserved in neutral buffered formalin and paraffin-embedded is suitable for use. Specimens should e.g. be blocked into a thickness of 3 or 4 mm and fixed for 18-24 hours in neutral buffered formalin. The tissues are then dehydrated in a graded series of ethanol and xylene, followed by infiltration by melted paraffin held at no more than 60 °C. Properly fixed and embedded tissues will keep indefinitely prior to sectioning and slide mounting if stored in a cool place (15-25 °C) (16-17). Other fixatives are not suitable.

Tissue specimens should be cut into sections of 4-6 µm.

The slides required for *HER2* gene amplification analysis and verification of tumor presence should be prepared at the same time. A minimum of two serial sections is recommended, one section for tumor presence stained with hematoxylin and eosin (H&E stain), and one section for *HER2* gene amplification analysis. It is recommended that tissue sections are mounted on Dako FLEX IHC Microscope Slides, Code K8020. Superfrost Plus slides (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ) are also suitable. Ensure that the glass slides have not passed expiry date. Specimens should be analyzed within <6 months of sectioning when stored at 2-25 °C.

NOTE: The tissue specimens must be placed on the glass within the defined slide staining area. Please consult the Dako Omnis Basic User Guide for dimensions of slide staining area.

INSTRUCTIONS FOR USE - Breast

A. Reagent Preparation - Breast

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) vial contains a gold-coated metal ball used for mixing. Prior to loading the vial onto Dako Omnis, the reagent must be thawed and thoroughly mixed as it phase separates during freezing.

Use the Dako Omnis Mixing Device for probe mixing.

Follow the procedure below for probe mixing on Dako Omnis Mixing Device and consult the Mixing Device User Guide for further details.

1. Take out the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) vial from the freezer.
2. Load the vial onto the Dako Omnis Mixing Device.
3. Connect the Mixing Device and ensure the green status light is on
Select the program "Thaw + mix". **Important:** Vials stored **below** –25 °C should be thawed (only just) before loading the vial onto the Dako Omnis Mixing Device and the "Mix" program should be used.
4. Remove the vial from the Mixing Device.
5. Open the flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out position (consult the Dako Omnis Basic User Guide for details).
6. Immediately load the vial into the Reagent Storage Module on the Dako Omnis instrument. If the continuous reagent loading feature is used during the staining run, ensure that the time from mixing to aspiration of the vial at Dako Omnis is at least 10 minutes.

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) probe can be re-thawed and used up to 10 times.

Always mix the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) probe mix just prior to loading onto the instrument. Do not shake. The total onboard stability of ISH *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) shall after onboard time at Dako Omnis immediately be transferred to < –18 °C (–18 °C to –25°C is recommended).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Prepare a working solution by diluting the ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 as follows:

1. Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.
4. Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and the bulk bottle).
5. Immediately load the Bulk bottle onto the Dako Omnis instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18 °C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Prepare a working solution by diluting the ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 as follows:

1. Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.
4. Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and then the bulk bottle).
5. Immediately load the bulk bottle onto the Dako Omnis Instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for up to 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18 °C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). After run completion, ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) can be transferred to storage temperature (2-8 °C) to preserve onboard stability time.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

ISH Pepsin (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, ensure the reagent is thawed and open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Pepsin (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). After run completion, ISH Pepsin (Dako Omnis) should be transferred to storage temperature at -18-8 °C to preserve onboard stability time.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) is a ready-to-use mounting medium used off-board the Dako Omnis instrument. Transfer Fluorescence Mounting Medium to storage temperature (2-8 °C) immediately after use.

A.7 Additional accessories

The following accessories should furthermore be loaded onboard Dako Omnis: Deionized water, diluted Wash Buffer 20x (Dako Omnis), Code GC807, Clearify™, Code GC810, ISH Cleaning Solution, Code GC207 and ISH Lid (Dako Omnis), Code GC102 as specified in the Dako Omnis User Guide(s).

B. Staining Procedure - Breast

B.1 Procedural notes

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is the hybridization probe for the automated direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay onboard the Dako Omnis instrument and is, together with accessory reagents GM300, GM301, GM302, GM303 and GM304 (GM304 outside

the instrument), designed to quantitatively determine *HER2* gene amplification. Prior to use, the user should read all instructions carefully and become familiar with all components and their precautions.

The automated FISH staining procedure on Dako Omnis includes deparaffinization of tissue sections, target retrieval, pepsin digestion, hybridization and stringent wash. The slides are unloaded in the dry unloading station. All protocol steps are pre-programmed into the Dako Omnis software.

Please consult the Dako Omnis User Guide(s) for instructions on loading of slides, ISH Lid, reagents, etc. Three validated *HER2* IQFISH protocols: *HER2* IQFISH Pepsin Short, *HER2* IQFISH Pepsin Medium and *HER2* IQFISH Pepsin Long that only differ in pepsin digestion time, are pre-programmed into the Dako Omnis software and can be selected for each of the five slides in the Slide Rack. This allows optimization of the tissue digestion which may depend on pre-analytical conditions. The *HER2* IQFISH Pepsin Medium protocol is regarded as the standard protocol. The different staining protocols can be viewed on the Dako Link Omnis Workstation.

B.2. Pre-staining procedure

1. Choose the *HER2* IQFISH protocol to be applied for each slide from the Dako Link Omnis Workstation software under IQFISH protocols.
2. Print slide labels and attach them to the glass slides.
3. Place the slides in the Slide Rack. Consult the Dako Omnis Basic User Guide for details. A Slide Rack can hold from one to five slides. It is recommended that at least two slides are stained in a *HER2* IQFISH staining run.
4. Load the Slide Rack onto Dako Omnis.
5. Load ISH Lid (one ISH Lid per Slide Rack) onto Dako Omnis.
6. Ensure that bulk bottles with fluids are onboard and registered by the Dako Omnis instrument. Bulk bottle fluids: Clearify™ (clearing agent), diluted ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), diluted ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) and diluted Wash Buffer (Dako Omnis).
7. Load ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) and ISH Pepsin (Dako Omnis), the freshly mixed *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and ISH Cleaning Solution into the Reagent Storage Module. Ensure that all flip top vial caps are open.
8. Follow the instructions on the Touch Screen and tap “Done” to initiate the staining procedure.

B.3. Staining procedure

The *HER2* IQFISH staining procedure at the Dako Omnis instrument (summarized in Table 1) can be monitored on the Dako Link Omnis Workstation:

Table 1. Simplified overview of the *HER2* IQFISH staining protocol steps.

Step	Reagent	Time and temperature
Dewax	Clearify™ (clearing agent)	10 minutes, 38 °C
Target retrieval	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minutes, 97 °C
Wash	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 x 3 minutes, 32 °C
Digestion*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minutes, 15 minutes or 20 minutes
Drying		15 minutes, 45 °C
Denaturation		10 minutes, 66 °C
Hybridization	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)	75 minutes, 45 °C
Stringent wash	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minutes, 61 °C

* Three validated pepsin digestion times can be chosen using the *HER2* IQFISH protocols stated above.

If no further ISH stainings are imminent, transfer all reagents to the recommended storage temperatures.

B.4. Post-staining procedure

Unload slides and apply up to 30 µL of Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) containing DAPI to the target area of the slide. The tissue section must be completely covered by Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Apply a glass coverslip.

NOTE: Slides may be read after 15 minutes or within 7 days after mounting. However, fading occurs if slides are exposed to light or high temperatures. To minimize fading, store slides in the dark at -18-8 °C.

Quality Control - Breast

1. Signals must be bright, distinct and easy to evaluate.
2. Normal cells allow for an internal control of the staining run.
 - Normal cells should have 1-2 clearly visible green signals indicating that the CEN-17 PNA probe has successfully hybridized to the centromeric region of chromosome 17.
 - Normal cells should also have 1-2 clearly visible red signals indicating that the *HER2* DNA probe has successfully hybridized to the *HER2* gene(s).
 - Due to tissue sectioning, some normal cells will have less than the expected two signals of each color.
 - Failure to detect signals in normal cells indicates assay failure, and results should be considered invalid.
3. Nuclear morphology must be intact when evaluated using a DAPI filter. Numerous ghost-like cells and a general poor nuclear morphology indicate over-digestion of the specimen, resulting in loss or fragmentation of signals. Such specimens should be considered invalid.
4. A minimum of 20 tumor cells must be assessable.
5. Differences in tissue fixation, processing, and embedding in the user's laboratory may produce variability in results, necessitating regular evaluation of in-house controls.

Interpretation of Staining - Breast

Assessable tissue

Only specimens from patients with invasive carcinoma should be tested. In cases with carcinoma in situ and invasive carcinoma in the same specimen, only the invasive component should be scored. Avoid areas of necrosis and areas where the nuclear borders are ambiguous. Do not include nuclei that require subjective judgement. Skip nuclei with weak signal intensity and non-specific or high background.

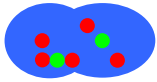



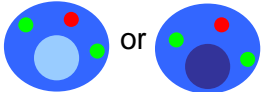
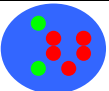



Signal enumeration

Locate the tumor within the context of the H&E stained slide and evaluate the same area on the FISH stained slide. Scan several areas of tumor cells to account for possible heterogeneity. Select an area having good nuclei distribution. Begin analysis in the upper left quadrant of the selected area and, scanning from left to right, count the number of signals within the nuclear boundary of each evaluated nucleus according to the guidelines below (see also Appendix 2).

- Focus up and down to find all of the signals in the individual nucleus
- Count two signals that are the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of the signal as only one signal
- In nuclei with high levels of *HER2* gene amplification, the *HER2* signals may be positioned very close to each other forming a cluster of signals. In these cases the number of *HER2* signals cannot be counted, but must be estimated. Special attention must be paid to the green signals, as clusters of *HER2* signals can cover the green signals making them impossible to see. In case of doubt, please check the green signals using a specific FITC filter.

Do not score nuclei without signals or with signals of only one color. Score only those nuclei with one or more FISH signals of each color.

Signal counting guide

1		Do not count. Nuclei are overlapping, not all areas of nuclei are visible
2		Two green signals, do not score nuclei with signals of only one color
3		Count as 3 green and 12 red signals (cluster estimation)
4		Count as 1 green and 1 red signal. Two signals of the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of one signal are counted as one
5		Do not count (over- or underdigested nuclei). Missing signals in the centre of nuclei (donut-shaped nuclei).
6		Count as 2 green and 3 red signals. Two signals of the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of one signal are counted as one
7		Count as 1 green and 5 red signals
8		Count as 3 green (1 green out of focus) and 3 red signals
9		Cluster of red signals hiding green signals, check the green signals with a specific FITC filter, or do not count

Record counts in a table as shown in Appendix 1.

Count 20 nuclei per tissue specimen, when possible from distinct tumor areas (18).

Calculate the *HER2*/CEN-17 ratio by dividing the total number of red *HER2* signals by the total number of green CEN-17 signals.

Specimens with a *HER2*/CEN-17 ratio above or equal to 2 should be considered *HER2* gene amplified (3, 18-20).

Results at or near the cut-off (1.8-2.2) should be interpreted with caution.

If the ratio is borderline (1.8-2.2), count an additional 20 nuclei and recalculate the ratio for the 40 nuclei.

In case of doubt, the specimen slide should be re-scored. For borderline cases a consultation between the pathologist and the treating physician is warranted.

Limitations - Breast

1. For automated use on Dako Omnis instruments, only.
2. Specialized training is required for tissue selection, fixation, and slide preparation and for IQFISH staining interpretation. Interpretation of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) stains should not be performed by individuals with color vision deficiency.
3. FISH results are dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may influence on probe hybridization. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.
4. The performance of the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay has not been evaluated on breast tumor samples with microcalcifications.

Performance Characteristics – Breast

Hybridization efficiency

Hybridization efficiency of *HER2* IQFISH pharmDx™ was investigated using 180 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections tested at three study sites. All 180 tissue sections could be enumerated in accordance with product enumeration guidelines. The hybridization efficiency was 100%.

The *HER2*/CEN-17 ratios calculated and used in the performance characteristics studies are based on counting signals in 20 nuclei using the scoring guidelines given in the Interpretation of Staining section of this Instruction for Use.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was investigated using 20 different breast carcinoma tissue specimens (10 samples with amplified *HER2* gene status and 10 non-amplified samples). The ratio between the number of *HER2* signals and CEN-17 signals was calculated based on counting signals in 20 nuclei of normal cells within the tissue sample. The *HER2*/CEN-17 ratio for normal cells identified in the 20 breast carcinoma tissue specimens was between 0.97-1.11.

Analytical specificity

The *HER2* DNA probes in the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) have been end-sequenced and mapped to confirm a total coverage of 218 kb including the *HER2* gene.

The CEN-17 PNA probes in the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) have been tested by FISH, individually and in combination, to confirm their specific hybridization to the centromeric region of chromosome 17.

To exclude cross-hybridization to chromosomes other than chromosome 17, studies were performed on metaphase spreads according to standard Dako QC procedures. A total of 275 metaphase spreads with distinct signals were evaluated for specific hybridization of the *HER2* DNA and CEN-17 PNA probe mixes. In all 275 cases, the hybridization was specific for chromosome 17. No cross-hybridization to loci on other chromosomes was observed in any of the 275 cases. Probe specificity was thus 100% (275 of 275).

To measure the IQFISH assay's ability to solely identify the target substances *HER2* and CEN-17 without interference from other substances, studies were performed on tissue specimens of breast carcinoma by omitting the *HER2* and CEN-17 probes from the

hybridization mixture and only using the hybridization buffer. A total of 20 specimens were evaluated for presence of signals not related to the probe mix. No detection of other chromosome targets or interference with closely related substances was observed in any of the 20 specimens.

Robustness studies

The robustness of the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay was tested by varying PNA probe concentration, target retrieval time, pepsin incubation time, denaturation time, hybridization time, and stringent wash time and temperature. The different parameters were tested on five FFPE breast cancer tissue specimens (both amplified and non-amplified tissue specimen were represented).

All parameters were tested both below and above standard protocol settings with the exception of PNA probe concentration and stringent wash temperature in which the standard protocol setting was included in the setup.

The test parameters were:

PNA probe concentration: Tested at 100% and +/-17%.

Target retrieval time: Tested at 13 min 45 s and 16 min 15 s.

Pepsin incubation time: Tested at 14 min 45 s and 16 min 15 s.

Denaturation time: Tested at 9 min 45 s and 10 min 45 s.

Hybridization time: Tested at 70 min and 80 min.

Stringent wash time: Tested at 8 min 45 s and 11 min 15 s.

Stringent wash temp.: Tested at 59 °C, 61 °C and 63 °C.

The three PNA probe concentrations were assessed in a fractionated Design of Experiment (JMP tool, SAS), which was performed with 12 different staining protocols as indicated in Table 2.

Table 2. Twelve different staining protocols used in the robustness study.

Robustness Protocol no.	Test parameter						
	Target retrieval time (min)	Pepsin time (min)	Denaturation time (min)	Hybridization time (min)	Stringent wash time (min)	Stringent wash temp (°C)	PNA conc. in probe mix
1	16.25	16.25	9.75	80	8.75	59	83%
2	13.75	14.75	10.75	70	8.75	59	100%
3	16.25	14.75	9.75	70	8.75	63	100%
4	13.75	14.75	10.75	80	8.75	61	83%
5	13.75	14.75	9.75	80	11.25	59	117%
6	13.75	16.25	10.75	70	11.25	63	83%
7	13.75	16.25	10.75	70	11.25	63	100%
8	16.25	14.75	9.75	70	11.25	61	83%
9	13.75	16.25	9.75	70	8.75	61	117%
10	16.25	16.25	10.75	70	11.25	59	117%
11	16.25	16.25	10.75	80	11.25	61	100%
12	16.25	14.75	10.75	80	8.75	63	117%

All five tissue specimens were stained using all 12 protocols.

The readout for the robustness study was signal intensity and morphology quality. All protocols produced staining in all tissue specimens (60 in total) with signals that were bright, distinct and easy to evaluate, thus suitable for signal enumeration.

Furthermore, the effect of tissue thickness on the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay results was tested by varying the section thickness of FFPE breast cancer tissue specimens.

A total of five consecutive sections of five human breast carcinoma specimens with different thickness (3, 4, 5, 6, and 7 μm) were tested with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). The average coefficient of variation of the *HER2*/CEN-17 ratio was 5.8% (ranging from 4.3% to 7.1%).

Reproducibility

The within laboratory day-to-day and lot-to-lot reproducibility were tested using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). The study was designed as an internal, blinded, randomized study of *HER2*/CEN-17 ratios using sections from eight different formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer specimens with different levels of *HER2* gene amplification. The eight specimens had been tested with HercepTest™ and represented two specimens with *HER2* IHC 0/1+, two specimens with *HER2* IHC 2+, two specimens with *HER2* IHC 3+, and two specimens with pre-determined *HER2*/CEN-17 FISH ratio between 1.5 and 2.5 obtained using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731). Each specimen was stained with three different lots of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) on five non-consecutive days. A total of 240 tissue stainings were processed for the entire study as each combination was stained in duplicates. Variation in the ratios between days and lots are illustrated in Figure 1. Data were analyzed using Box-Cox transformation via a Random Effect Model to obtain data variance homogeneity. The total coefficient of variation was estimated to be 4.3% and it was found that day and lot variation contributed with 1.5% and 0%, respectively.

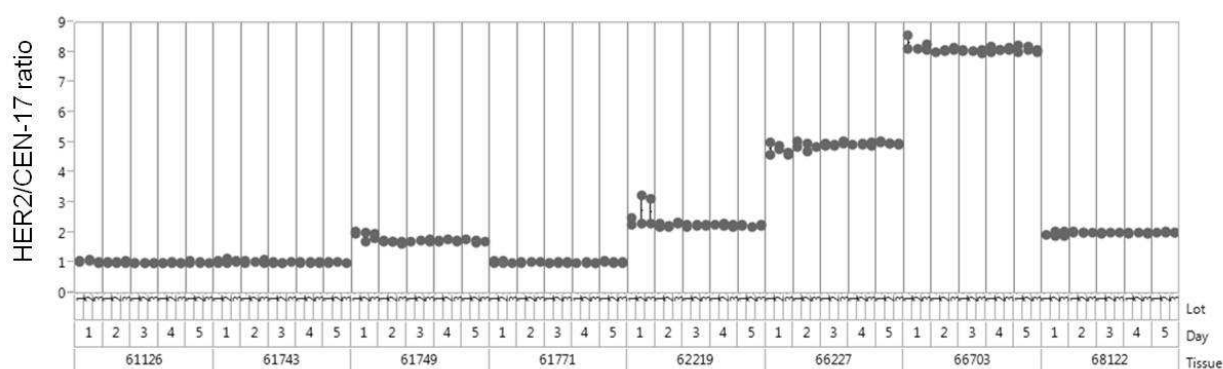


Figure 1. *HER2*/CEN-17 ratios obtained in a within laboratory reproducibility study on *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), including lot-to-lot and day-to-day reproducibility endpoints.

Additionally, the day-to-day and site-to-site reproducibility of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) were tested externally in a three-site (one site in USA and two sites in Europe), stratified and blinded study on tissue sections from 12 different formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer specimens. Three specimens were *HER2* IHC 0/1+, three specimens were *HER2* IHC 2+, three specimens were *HER2* IHC 3+, and three specimens had pre-determined *HER2*/CEN-17 FISH ratio between 1.5 and 2.5 obtained using HercepTest™ and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731), respectively. The specimens were stained and analyzed at the study sites. Each specimen was stained for a minimum of five times on five non-consecutive days and scored by one observer at each site. 192 sections were stained and included in the statistical analysis. Data were

analyzed using Box-Cox transformation and variance components were calculated. The total coefficient of variation based on the upper 95% confidence limit was 15%. *HER2/CEN-17* ratio variation for day and site is presented in Figure 2.

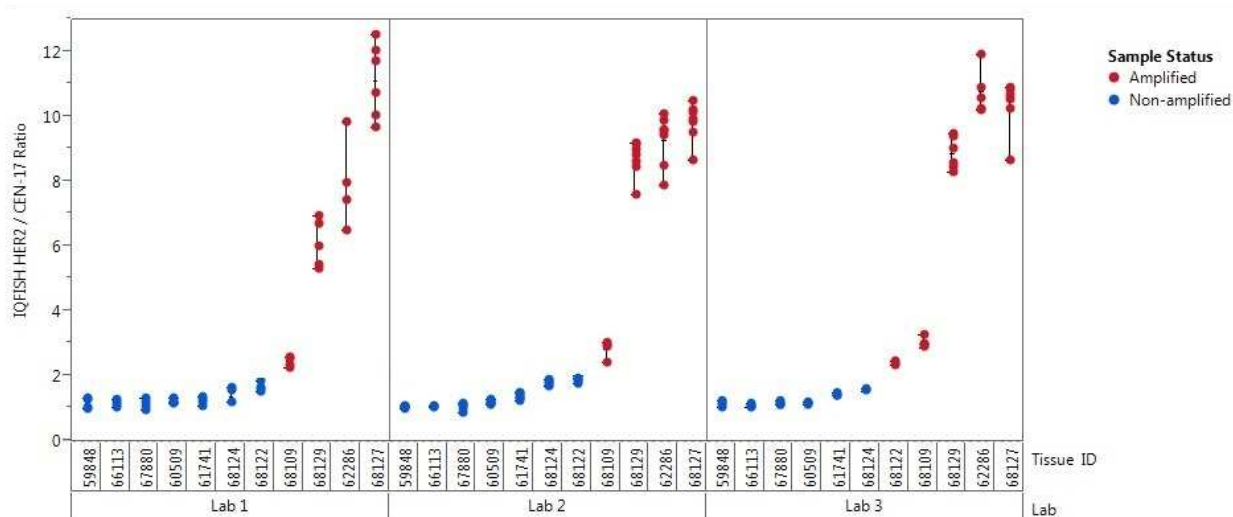


Figure 2. Variability chart of *HER2/CEN-17* ratios in non-transformed units obtained in the day-to-day and site-to-site reproducibility study of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) on breast cancer tissue specimens.

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay was tested for observer-to-observer reproducibility as part of the internally conducted method comparison study using three observers to score the stained specimens independently. Reproducibility was tested on 140 different human breast carcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Data were analyzed using Box-Cox transformation. The average coefficient of variation for observer-to-observer was 9%.

Repeatability

The within laboratory repeatability of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was tested using consecutive sections of eight human breast carcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Tissues were tested in duplicates on five non-consecutive days with three different lots in a total of 240 slides (120 sections in duplicate). The Random Effects Model used for data analysis resulted in variance attributable to days and lots (as indicated in the internal reproducibility study). The residual variance equals the variance between replicas and thereby repeatability. The upper 95% confidence limit for the repeatability coefficient of variation was 4.4%.

Method comparison studies

Comparison of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) results with *HER2* IQFISH pharmDx™ results

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was compared with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) in a comparative study on 140 human breast carcinoma tissue specimens. The specimens consisted of 77 *HER2*-non-amplified cases and 63 *HER2*-amplified cases with known HercepTest™ score as shown in Table 3.

Table 3. Distribution of specimens based on HercepTest™ score and *HER2* FISH score (*HER2* gene status) obtained with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731).

HercepTest™ staining score	0	1+	2+	3+	Total
n	27	11	53	49	140
<i>HER2</i> FISH status					
Amplified	2	0	13	48	63
Non-amplified	25	11	40	1	77
Total FISH-tested samples	27	11	53	49	140

Results of the cross tabulation of *HER2* gene status obtained by the two assays with calculation of overall percent agreement (OPA), positive percent agreement (PPA), and negative percent agreement (NPA) are shown in Table 4. Correlation between *HER2*/CEN-17 ratios using the two assays is shown in Figure 3.

Table 4. Cross tabulation of *HER2* gene status obtained using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		<i>HER2</i> gene status (K5731)		Total
		Non-amplified	Amplified	
<i>HER2</i> gene status (Dako Omnis)	Non-amplified	77	0	77
	Amplified	0	63	63
Total		77	63	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				

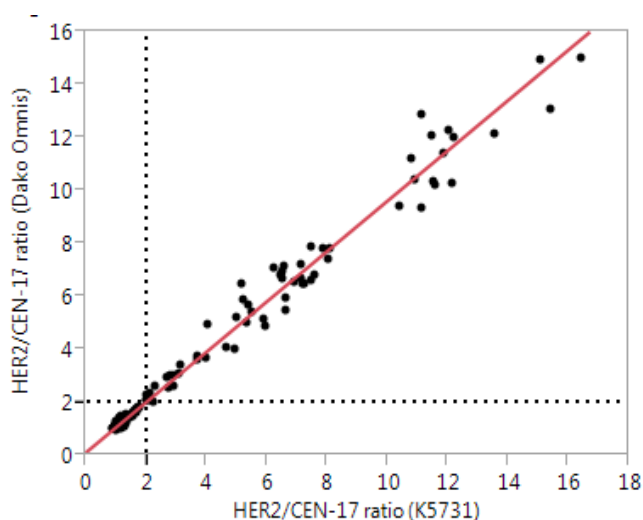


Figure 3. Correlation between *HER2*/CEN-17 ratios using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) on 140 breast cancer specimens (linear fit: $y = 0.11 + 0.95x$; $R^2 = 0.97$. Weighted with inverse variance to allow for linear fit).

HER2/CEN-17 ratios were log-transformed for analysis. The 95% confidence interval for the average difference between the two staining methods at *HER2*/CEN-17 ratio = 2 was found to be [0.002; 0.031]. This means a difference higher than 3% is not expected with 95% confidence.

The Root Mean Square Error (RMSE) was found to be 9% indicating the size of the average fluctuation around the average value.

Comparison of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) results with PathVysion *HER2*-2 DNA Probe Kit results

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was compared with the PathVysion *HER2*-2 DNA Probe Kit in a comparative study on 140 human breast carcinoma tissue specimens. The specimens consisted of 80 *HER2*-non-amplified cases and 60 *HER2*-amplified cases with known HercepTest™ score as shown in Table 5.

Table 5. Distribution of specimens based on HercepTest™ score and *HER2* FISH score (*HER2* gene status) obtained with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731).

HercepTest™ staining score	0	1+	2+	3+	Total
n	28	10	54	48	140
<i>HER2</i> FISH status					
Amplified	1	0	12	47	60
Non-amplified	27	10	42	1	80
Total FISH-tested samples	28	10	54	48	140

Results of the cross tabulation of *HER2* gene status obtained by the two assays with calculation of overall percent agreement (OPA), positive percent agreement (PPA), and negative percent agreement (NPA) are shown in Table 6. Correlation between the *HER2*/CEN-17 ratios using the two assays is shown in Figure 4.

Table 6. Cross tabulation of *HER2* gene status obtained using PathVysion *HER2*-2 DNA Probe Kit and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		<i>HER2</i> gene status (PathVysion)		Total
		Non-amplified	Amplified	
<i>HER2</i> gene status (Dako Omnis)	Non-amplified	80	0	80
	Amplified	0	60	60
Total		80	60	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				

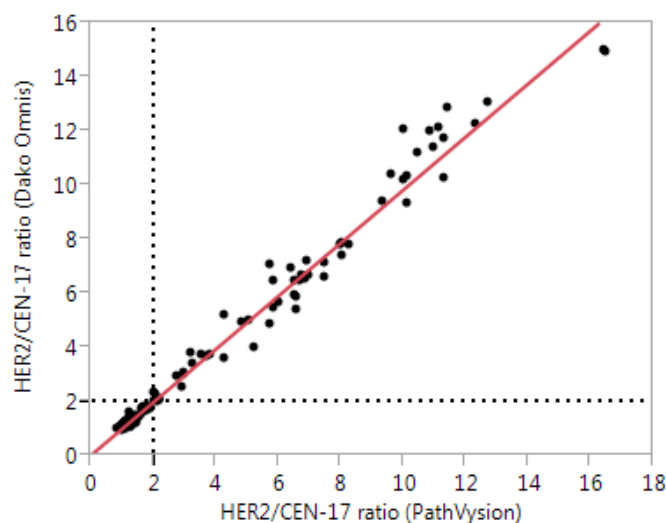


Figure 4. Correlation between *HER2*/CEN-17 ratios using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and PathVysion on 140 breast cancer specimens (linear fit: $y = 0.01 + 0.98x$; $R^2 = 0.96$. Weighted with inverse variance to allow for linear fit).

HER2/CEN-17 ratios were log-transformed for analysis. The 95% confidence interval for the average difference between the two staining methods at *HER2/CEN-17* ratio =2 was found to be [0.001; 0.031]. This means a difference higher than 3% is not expected with 95% confidence.

The Root Mean Square Error (RMSE) was found to be 10% indicating the size of the average fluctuation around the average value.

Clinical utility in selection of patients for Herceptin™ (trastuzumab) treatment

HER2 FISH pharmDx™ Kit was investigated in comparative studies with both the PathVysion *HER-2* DNA Probe Kit and Dako HercepTest™. Results of *HER2* FISH testing are available for a total of 940 breast cancer specimens.

Comparison of *HER2* FISH pharmDx™ Kit results with PathVysion *HER-2* DNA Probe Kit test results

Three studies have been performed that compare the results of the *HER2* FISH pharmDx™ Kit test to the results of the PathVysion *HER-2* DNA Probe Kit test (see Table 7). The studies were performed in geographically separate locations, and there was no overlap in the use of specimens. A total of 328 specimens have been tested.

Table 7. Summary data of FISH method comparison studies.

Study designation	Concordance study (Danish specimens, N=190)	Concordance study (Japanese specimens, N=52)	Concordance study (French specimens, N=86) (21)*
Concordance (95% confidence interval)	93.68% (90.22% - 97.14%)	96.15%	
Positive percent agreement (95% confidence interval)	86% (77.34% - 95.08%)	97%	
Negative percent agreement (95% confidence interval)	97% (94.05% - 99.89%)	96%	

* Comparison data were provided in the article, but the *HER2* FISH assay was not identified.

There were a total of 12 discrepant test results between *HER2* FISH pharmDx™ Kit test and PathVysion™ *HER-2* DNA Probe test for the Danish clinical specimens (see Table 8).

Table 8. Summary of data for the 12 discrepant test results.

<i>HER2</i> FISH(positive)/PathVysion(negative)				<i>HER2</i> FISH(negative)/PathVysion(positive)			
ID#	<i>HER2</i> FISH ratio	PathVysion ratio	HercepTest score	ID#	<i>HER2</i> FISH ratio	PathVysion ratio	HercepTest score
160	2.10* (1.82-2.51)	1.51 (1.39-1.68)	2+	234	1.68 (1.38-1.83)	2.02* (1.84-2.29)	2+
208	3.61 (2.95-4.73)	1.62 (1.51-1.82)	2+	284	1.44 (1.07-1.83)	2.21* (1.94-2.64)	2+
306	2.20* (1.79-2.24)	1.33 (1.18-1.44)	1+	423	1.7 (1.52-1.95)	2.15 (2.02-2.45)	1+
846	2.58 (2.06-3.50)	1.51 (1.42-1.76)	2+	474	1.44 (1.16-1.83)	2.55 (2.38-3.26)	2+
				735	1.68 (1.40-1.99)	2.03* (1.89-2.19)	2+
				746	1.05 (0.96-1.18)	4.53 (4.27-5.17)	3+
				837	1.52 (1.48-1.79)	2.15 (2.10-2.67)	3+
				881	1.83* (1.15-2.69)	2.68 (2.39-3.14)	2+

* CI of mean log ratios included 2.0. Numbers in parentheses are the 95% CI

In this discrepancy analysis, logged ratios were used. The 95% confidence interval was calculated for the 60 logged ratios from the nuclei that were used to calculate the PathVysion HER-2 DNA Probe ratio. For the 4 instances where *HER2* FISH pharmDx™ Kit was positive and PathVysion HER-2 DNA Probe was negative, no interval included the critical value of 2. Of the 8 instances where *HER2* FISH pharmDx™ Kit was negative and PathVysion HER-2 DNA Probe was positive, the 95% CI of 3 (#234, 284 and 735) included the critical value of 2. Similarly, the 95% confidence interval was calculated for the logged ratios from the nuclei that were used to calculate the *HER2* FISH pharm Dx™ Kit ratio. For the 4 instances where *HER2* FISH pharmDx™ Kit was positive and PathVysion HER-2 DNA Probe was negative, 2 included the critical value of 2 (#160 and 306). Of the eight instances where *HER2* FISH pharmDx™ Kit was negative and PathVysion HER-2 DNA Probe was positive, the 95% CI of 1 (#881) included the critical value of 2.

Comparison of *HER2* FISH pharmDx™ Kit results with HercepTest™ results

Four studies comparing *HER2* FISH pharmDx™ Kit to HercepTest™ results have been conducted. A total of 940 specimens have been compared, using 3+ staining score result as a positive IHC result in the HercepTest™ assay (see Table 9).

Table 9. Summary of *HER2* FISH pharmDx™ Kit and IHC (HercepTest™) comparison studies.

Study designation	Danish clinical specimens (N=682)	Japanese specimens (N=52)	French study (N=86) (31)	Danish pilot study (N=120) (22)
Concordance (95% confidence interval)	93.11% (91.21% - 95.01%)	96.15%	87.21%	93.33%
Positive percent agreement (95% confidence interval)	91% (87.39% - 94.57%)	96%	87%	84%
Negative percent agreement (95% confidence interval)	94% (92.12% - 96.46%)	96%	87%	97%

Distribution data of HercepTest™ and *HER2* FISH test results for the Danish clinical specimens are presented in Table 10.

Table 10. Distribution of *HER2* status by HercepTest™ and *HER2* FISH pharmDx™ Kit.

HercepTest™ staining score	0	1+	2+	3+	Total
n	221	267	84	248	820
%	27	33	10	30	100%
<i>HER2</i> FISH status					
Amplified	0	8	17	222	247
Non-amplified	106	245	62	22	435
Total FISH-tested samples	106	253	79	244	682

Troubleshooting - Breast

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No signals or weak signals	<p>1a. Reagents have been exposed to high temperatures during transport or storage</p> <p>1b. Microscope not functioning properly</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inappropriate filter set - Improper lamp - Mercury lamp too old - Dirty and/or cracked collector lenses - Unsuitable immersion oil <p>1c. Faded signals</p> <p>1d. Buffers identified incorrectly</p>	<p>1a. Check storage conditions. Ensure that dry ice was present when the IQISH probe mix and pepsin shipments were received. Ensure that the reagents have been stored as specified.</p> <p>1b. Check the microscope and ensure that the used filters are suitable for use with the probe mix fluorochromes, and that the mercury lamp is correct and has not been used beyond expected lifetime (see Appendix 2). In case of doubt, please contact your local microscope vendor.</p> <p>1c. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light sources.</p> <p>1d. Replace bulk buffers and ensure correct registration (at Workstation) and identification (at Touch Screen) of bulk buffers. Consult Dako Omnis Basic User Guide for further details. Please note: ISH Pre-Treatment Solution is green and ISH Stringent Wash Buffer is yellow.</p>
2. Areas without signal	2. Air bubbles caught during mounting	2. Avoid air bubbles. If observed, gently tap them away using forceps.
3. Excessive background staining	<p>3a. Inappropriate tissue fixation</p> <p>3b. Prolonged exposure of hybridized section to strong light</p>	<p>3a. Ensure that only formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are used.</p> <p>3b. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light.</p>
4. Poor tissue morphology	4a. Incorrect Pepsin treatment	4a. Change to another of the three different staining protocols. Ensure that the ISH Pepsin (Dako Omnis) is stored at the correct temperature.

Breast Cancer

Problem	Probable Cause	Suggested Action
	4b. Too long Pepsin treatment or very thin section thickness may cause ghost cells or donut cells to appear	4b. Attempt a staining protocol with shorter pepsin incubation time. Ensure that the section thickness is 4-6 μm .
5. High level of green auto fluorescence on slide including areas without FFPE tissue	5. Use of expired or non-recommended glass slides	5. Choose glass slides as specified. Ensure that the glass slides have not passed expiry date.

NOTE: If the problem cannot be attributed to any of the above causes, or if the suggested corrective action fails to resolve the problem, please call Dako Technical Services for further assistance.

Appendix 1 - Breast

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code GM333

Scoring Scheme

Staining Run Log ID: _____

Date of the run: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Lot: _____ Specimen ID: _____

Count signals in 20 nuclei					
Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)	Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total (1-10)			Total (11-20)		

For determination of the *HER2*/CEN-17 ratio, count the number of *HER2* signals and the number of CEN-17 signals in the same 20 nuclei and divide the total number of *HER2* signals by the total number of CEN-17 signals. If the *HER2*/CEN-17 ratio is borderline (1.8-2.2), count an additional 20 nuclei and recalculate the ratio for the 40 nuclei.

A ratio at or near the cut-off (1.8-2.2) should be interpreted with caution (see counting guide).

	<i>HER2</i>	CEN-17	<i>HER2</i> /CEN-17 ratio
Total score (1-20)			

Count signals in additional 20 nuclei					
Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)	Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)
21			31		
22			32		
23			33		
24			34		
25			35		
26			36		
27			37		
28			38		
29			39		
30			40		
Total (21-30)			Total (31-40)		

Calculate the *HER2*/*CEN-17* ratio based on the 40 counted nuclei

	<i>HER2</i>	<i>CEN-17</i>	<i>HER2/CEN-17 ratio</i>
Total score (1-40)			

- Ratio < 2: *HER2* gene amplification was not observed
- Ratio ≥ 2: *HER2* gene amplification was observed

Date and signature, Technician: _____

Date and signature, Pathologist: _____

For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.

Appendix 2 - Breast

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code GM333

Fluorescence Microscope Specifications

Dako recommends the following equipment for use with *HER2 IQFISH pharmDx™*, (Dako Omnis), GM333:

1. Microscope type

- Epifluorescence microscope

2. Lamp

- 100 watt mercury lamp (keep record of burning time)

3. Objectives

- For screening of the tissue, oil immersion 16X or 20X objectives are applicable
- For high power magnification and for enumeration of signals, only oil immersion objectives, e.g. 100X are recommended

4. Filters

Filters are individually designed for specific fluorochromes and must be chosen accordingly. Dako recommends the use of a specific DAPI filter in combination with a high quality Texas Red/FITC double filter.

- DAPI filter, e.g. Chroma filter # 31000
- Texas Red/FITC double filter, e.g. Omega Optical filter # XF53 or Chroma filter # 51006
- Texas Red and FITC single filters can be used for confirmation and for enumeration

Fluorochrome	Excitation Wavelength	Emission Wavelength
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filters are specific to each microscope type and the use of appropriate filters is crucial for the interpretation. If you want detailed information, please contact your microscope provider or your Dako representative.

5. Oil

- Non-fluorescing oil

Precautions

- A 50 watt mercury lamp is not recommended
- Rhodamine filters cannot be used
- Triple filters are not recommended

A non-optimized microscope may cause problems when reading the fluorescent signals. It is important that the light source has not expired and that it is properly aligned and focused.

Customers should monitor and follow the manufacturer's recommendations for the mercury lamp. The microscope should be maintained and the mercury lamp should be in alignment prior to interpreting results.

An effort should be made to expose the sample to as little of the excitation light as possible in order to minimize fading of the fluorescence.

We recommend that you discuss the set-up of your particular microscope with the manufacturer before starting the fluorescence in situ hybridization, or refer to the literature.

Summary and Explanation - Gastric

The human *HER2* gene (also known as *ERBB2* or *NEU*) is located on chromosome 17 and encodes the HER2 protein or p185^{HER2}. The HER2 protein is a membrane receptor tyrosine kinase with homology to the epidermal growth factor receptor (EGFR or HER1) (1-2). The *HER2* gene is present in two copies in all normal diploid cells.

Overexpression of the HER2 protein and amplification of the *HER2* gene in gastric cancer have been shown in a large number of studies (reviewed in (23)). HER2 positivity can be detected in approximately 20% of the patients by either IHC or FISH (23). Preclinical in vitro and in vivo studies have demonstrated that trastuzumab (Herceptin™) is effective in different gastric cancer models, thus leading to the initiation of several clinical studies (23-27).

All of the patients in the phase III BO18255 (ToGA “An open-label, randomized, multicenter, phase III study of trastuzumab in combination with a fluoropyrimidine and cisplatin versus chemotherapy alone as first-line therapy in patients with HER2 positive advanced gastric cancer”) study sponsored by Hoffmann-La Roche AG were selected using Dako HercepTest™ (IHC) and Dako *HER2* FISH pharmDx™ Kit (FISH) with HER2 positivity defined as IHC 3+ or FISH+ (*HER2/CEN-17* ≥ 2.0). The study demonstrated the clinical utility of both HercepTest™ (IHC) and *HER2* FISH pharmDx™ Kit (FISH) for the assessment of HER2 status in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma for whom trastuzumab treatment is being considered (28).

No patients were enrolled whose tumors were not gene amplified but weakly to strongly HER2 protein overexpressing [FISH(-)/IHC 2+]. It is therefore unclear if patients whose tumors are not gene amplified but HER2 protein-overexpressing [i.e., FISH(-), IHC 2+ or 3+] would benefit from Herceptin™ treatment. The study also demonstrated that gene amplification (FISH) and protein overexpression (IHC) are not as correlated as with breast cancer, therefore a single method should not be used to determine HER2 status.

This product (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is an IQISH probe mix for automated direct FISH - detecting *HER2* gene amplification. This product should be used together with the specified accessory reagents onboard Dako Omnis and is derived from the manually performed *HER2* gene amplification assay, *HER2* IQFISH pharmDx™, Code K5731.

Principle of Procedure - Gastric

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is an IQISH probe consisting of a mixture of Texas Red-labeled DNA probes covering a 218 kb region including the *HER2* gene on chromosome 17 and a mixture of fluorescein-labeled peptide nucleic acid (PNA) (13) probes targeting the centromeric region of chromosome 17 (CEN-17). The specific hybridization to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each *HER2* gene locus and a distinct green fluorescent signal at each chromosome 17 centromere.

HER2 gene amplification assessment using the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), is a fully automated method on the Dako Omnis instrument. Three different validated *HER2* FISH staining protocols can be selected in the Dako Link Omnis Workstation software. The protocols differ only in pepsin digestion time, consequently pepsin digestion for 10 min (the Short protocol), 15 min (the Medium protocol) or 20 min (the Long protocol) can be chosen (see more below). The Medium protocol is recommended for initial analysis.

After staining onboard Dako Omnis the specimens are mounted with Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and coverslipped. Using a fluorescence microscope equipped with appropriate filters (see Appendix 5), tumor cells are located, and enumeration of the red (*HER2*) and green (CEN-17) signals is conducted. Then the *HER2/CEN-17* ratio is calculated. Normal cells in the analyzed tissue section will serve as an internal positive control of pre-treatment and hybridization efficiency.

For details see the Interpretation of Staining section.

Please consult the Dako Omnis User Guide(s) for detailed instructions on loading and unloading of slides, ISH Lids (Dako Omnis), Code GC102, reagents, bulk fluids and waste.

Reagents - Gastric

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and accessory reagents can be ordered separately as single reagents.

Materials provided

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis): 1.6 mL, ready-to-use, mix of Texas Red-labeled *HER2* DNA probes and fluorescein-labeled CEN-17 PNA probes, supplied in IQISH hybridization buffer. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is shipped on dry ice. **To ensure that the reagent has not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.** Reagent vials, with thawed content, should be stored and handled in an upright position at all times.

The reagent vial contains a gold-coated metal ball that enables reagent mixing using the Dako Omnis Mixing Device (see Dako Omnis Mixing Device User Guide). It is important that the reagent is thoroughly mixed before loading onto Dako Omnis.

Material required but not provided

Accessory reagents

The following reagents are needed onboard the Dako Omnis instrument for performing *HER2* gene amplification analysis with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis):

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, concentrated 20x; to be diluted in a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle (Code GC109). The product contains an antimicrobial agent and an inert green color for easy identification and user-friendliness.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL of 96% ethanol (ready-to-use).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL Pepsin A solution (ready-to-use), pH 2.0; contains stabilizer and an antimicrobial agent. Pepsin is shipped on dry ice. **To ensure that the reagent has not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.**

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis): 175 mL saline-sodium citrate buffer concentrated 20x; to be diluted 1:20 in a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle (CG109). The product contains an antimicrobial agent, a detergent and an inert yellow color for easy identification and user-friendliness.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0.8 mL fluorescence mounting medium (ready to use) with DAPI.

Although the above reagents are not provided with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), they are briefly described below. Please consult the Instructions For Use for each device for further information.

Additional reagents and devices

Dako Omnis, Code GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), Code GC807

Clarify™, Code GC810

Dako Omnis Mixing Device, Code GC116

ISH Lid, Code GC102

ISH Cleaning Solution, Code GC207

Glass coverslips for mounting (24 mm x 50 mm)

Please consult Dako Omnis Basic and Advanced User Guides for use of additional reagents and devices.

Microscope equipment and accessories

Filters for fluorescence microscope: DAPI and FITC/Texas Red double filter, or FITC and Texas Red mono filters - see Appendix 5 for details. Use of DAPI filter at high magnification negatively affects signal intensity. Long exposure times should be avoided.

Fluorescence microscope with a 100 watt mercury lamp as light source should be used. Other light sources are not recommended with these filters.

Microscope slide folder (cardboard tray for 20 slides with hinged cover or similar)

Precautions - Gastric

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) contains ≥10- <25% ethylene carbonate and ≥3- <5% sodium chloride. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is labeled:



Warning

H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear eye or face protection.
P264	Wash hands thoroughly after handling.
P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product.

Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet for additional information.

4. Tissue specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and should be disposed of with proper precautions (14). Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
5. Minimize microbial contamination of reagent to avoid erroneous results.
6. Tissue fixation methods and thickness of specimen other than those specified may affect tissue morphology and/or signal intensity.
7. The reagent has been optimally diluted. Further dilution may result in loss of performance.
8. Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin. Please refer to the Safety Data Sheet (SDS) for additional information.
9. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
10. Due to the heterogeneous nature of gastric cancer specimens it is important to perform a thorough scanning of the entire specimen to evaluate signal distribution before selecting the area for signal enumeration.
11. It is not recommended to evaluate very small specimens (i.e. specimens must have intact morphology and sufficient nuclei for enumeration).

12. If *HER2* FISH analysis is performed on a biopsy specimen, multiple (7-8) evaluable biopsies from different regions of the tumor should be analyzed to ensure reliable determination of *HER2* status.
13. For identification of all tissue cores in a biopsy sample it is important to inspect the H&E stained slide.
14. *HER2* gene amplification and *HER2* protein overexpression are not as well correlated in gastric cancer as with breast cancer; therefore a single method should not be used to determine *HER2* status.

Storage - Gastric

Store the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) at <-18 °C (-18 °C to -25 °C is recommended) in the dark. Keep the thawed reagent vial in an upright position at all times. Freezing and thawing the reagent for up to 10 times does not affect performance. Do not leave this component at room temperature.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and the accessory reagents ISH Pepsin (Dako Omnis) and Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) may be affected adversely if exposed to heat. Do not leave these components at room temperature.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and the accessory reagents Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store these components or perform analysis in strong light, such as direct sunlight.

Store the accessory reagents ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) and Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) in the dark at 2-8 °C. Store ISH Pepsin (Dako Omnis) at -18-8 °C. The vial cap, including the flip top cap, should be closed for all reagents during storage.

Diluted solutions (ISH Stringent Wash Buffer working solution and ISH Pre-Treatment Solution working solution) may be stored at 2-8 °C for 30 days.

Do not use the reagents after the expiration date stamped on the reagent container. During storage the cap, including the flip top cap, should be closed. If reagents are stored under conditions other than those specified the user must validate reagent performance (15).

There are no obvious signs indicating instability of this product. Therefore, it is important to evaluate normal cells in the analyzed tissue section. If an unexpected fluorescence pattern is observed which cannot be explained, and a problem with *HER2* IQFISH pharmDx™ is suspected, please contact Dako Technical Services.

Stability onboard the Dako Omnis instrument

Onboard stability of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and of the accessory reagents: ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) and ISH Pepsin (Dako Omnis) is 80 hours. Onboard stability of diluted ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) and ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) is 7 days. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software. The use of expired reagents will result in a warning by the Dako Omnis instrument; all slides stained with the expired reagent will change state to 'suspicious' and the slide log on the Workstation will show that an expired reagent has been used.

Specimen Preparation - Gastric

Gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma specimens from biopsies, excisions or resections must be handled to preserve the tissue for FISH analysis. Standard methods of tissue processing for immunohistochemical staining should be used for all specimens (16). When testing small biopsy specimens, ascertain intact tumor morphology and the presence of sufficient nuclei for enumeration. If *HER2* FISH analysis is performed on a

biopsy specimen, multiple (7-8) evaluable biopsies from different regions of the tumor should be analyzed to ensure reliable determination of HER2 status.

Paraffin-embedded sections

Only tissue preserved in neutral buffered formalin and paraffin-embedded is suitable for use. Specimens should e.g. be blocked into a thickness of 3 or 4 mm and fixed for 18-24 hours in neutral buffered formalin. Biopsy specimens were fixed for 6-8 hours in the ToGA trial [for study reference, refer to (28)]. The tissues are then dehydrated in a graded series of ethanol and xylene, followed by infiltration by melted paraffin held at no more than 60 °C. Properly fixed and embedded tissues will keep indefinitely prior to sectioning and slide mounting if stored in a cool place (15-25 °C) (16-17). Other fixatives are not suitable.

Tissue specimens should be cut into sections of 3-6 µm.

The slides required for *HER2* gene amplification analysis and verification of tumor presence should be prepared at the same time. A minimum of two serial sections is recommended, one section for tumor presence stained with hematoxylin and eosin (H&E stain), and one section for *HER2* gene amplification analysis. It is recommended that tissue sections are mounted on Dako FLEX IHC Microscope Slides, Code K8020. Superfrost Plus slides (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ) are also suitable. Ensure that the glass slides have not passed expiry date. Specimens should be analyzed within <6 months of sectioning when stored at 2-25 °C.

NOTE: The tissue specimens must be placed on the glass slide within the defined slide staining area. Please consult the Dako Omnis Basic User Guide for dimensions of slide staining area.

INSTRUCTIONS FOR USE - Gastric

A. Reagent Preparation - Gastric

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) vial contains a gold-coated metal ball used for mixing. Prior to loading the vial onto Dako Omnis, the reagent must be thawed and thoroughly mixed as it phase separates during freezing.

Use the Dako Omnis Mixing Device for probe mixing.

Follow the procedure below for probe mixing on Dako Omnis Mixing Device and consult the Mixing Device User Guide for further details.

1. Take out the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) vial from the freezer
2. Load the vial onto the Dako Omnis Mixing Device
3. Connect the Mixing Device and ensure the green status light is on
4. Select the program "Thaw + mix". **Important:** Vials stored **below** -25 °C should be thawed (only just) before loading the vial onto the Dako Omnis Mixing Device and the "Mix" program should be used.
5. Remove the vial from the Mixing Device.
6. Open the flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out position (consult the Dako Omnis Basic User Guide for details).
7. Immediately load the vial into the Reagent Storage Module on the Dako Omnis instrument. If the continuous reagent loading feature is used during the staining run, ensure that the time from mixing to aspiration of the vial at Dako Omnis is at least 10 minutes.

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) probe can be re-thawed and used up to 10 times.

Always mix the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) probe mix just prior to loading onto the instrument. Do not shake. The total onboard stability of ISH *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako

Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) shall after onboard time at Dako Omnis immediately be transferred to < -18 °C (-18 °C to -25 °C is recommended).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Prepare a working solution by diluting the ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 as follows:

1. Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.
4. Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and the bulk bottle).
5. Immediately load the Bulk bottle onto the Dako Omnis instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18 °C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Prepare a working solution by diluting the ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 as follows:

1. Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.
4. Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and then the bulk bottle).
5. Immediately load the bulk bottle onto the Dako Omnis Instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for up to 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18 °C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). After run completion, ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) can be transferred to storage temperature (2-8 °C) to preserve onboard stability time.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

ISH Pepsin (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, ensure the reagent is thawed and open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Pepsin (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software (see above). After run completion, ISH Pepsin (Dako Omnis) should be transferred to storage temperature at $-18-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ to preserve onboard stability time.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) is a ready-to-use mounting medium used off-board the Dako Omnis instrument. Transfer Fluorescence Mounting Medium to storage temperature ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) immediately after use.

A.7 Additional accessories

The following accessories should furthermore be onboard Dako Omnis: Deionized water, diluted Wash Buffer 20x (Dako Omnis), Code GC807, Clearify™ (Dako Omnis), Code GC810, ISH Cleaning Solution, Code GC207 and ISH Lid (Dako Omnis), Code GC102 as specified in the Dako Omnis User Guide(s).

B. Staining Procedure - Gastric

B.1 Procedural notes

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) is the hybridization probe for the automated direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay onboard the Dako Omnis instrument and is, together with accessory reagents GM300, GM301, GM302, GM303 and GM304 (GM304 outside the instrument), designed to quantitatively determine *HER2* gene amplification. Prior to use, the user should read all instructions carefully and become familiar with all components and their precautions.

The automated procedure on Dako Omnis includes deparaffinization of tissue sections, target retrieval, pepsin digestion, hybridization and stringent wash. The slides are unloaded in the dry unloading station. All protocol steps are pre-programmed into the Dako Omnis software.

Please consult the Dako Omnis User Guide(s) for instructions on loading of slides, ISH Lid, reagents, etc.. Three validated *HER2* IQFISH protocols: *HER2* IQFISH Pepsin Short, *HER2* IQFISH Pepsin Medium and *HER2* IQFISH Pepsin Long that only differ in pepsin digestion time, are pre-programmed into the Dako Omnis software and can be selected for each of the five slides in the Slide Rack. This allows optimization of the tissue digestion which may depend on pre-analytical conditions. The *HER2* IQFISH Pepsin Medium protocol is regarded as the standard protocol. The different staining protocols can be viewed on the Dako Link Omnis Workstation.

B.2. Pre-staining procedure

1. Choose the *HER2* IQFISH protocol to be applied for each slide from the Dako Link Omnis Workstation software under IQFISH protocols.
2. Print slide labels and attach them to the glass slides.
3. Place the slides in the Slide Rack. Consult the Dako Omnis Basic User Guide for details. A Slide Rack can hold from one to five slides. It is recommended that at least two slides are stained in a *HER2* IQFISH staining run.
4. Load the Slide Rack onto Dako Omnis.
5. Load ISH Lid (one ISH Lid per Slide Rack) onto Dako Omnis.
6. Ensure that bulk bottles with fluids are onboard and registered by the Dako Omnis instrument. Bulk bottle fluids: Clearify™ (clearing agent), diluted ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), diluted ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) and diluted Wash Buffer (Dako Omnis).

7. Load ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) and ISH Pepsin (Dako Omnis), the freshly mixed *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) and ISH Cleaning Solution into the Reagent Storage Module. Ensure that all flip top vial caps are open.
8. Follow the instructions on the Touch Screen and tap “Done” to initiate the staining procedure.

B.3. Staining procedure

The *HER2* IQFISH staining procedure at the Dako Omnis instrument (summarized in Table 11) can be monitored on the Dako Link Omnis Workstation:

Table 11. Simplified overview of the *HER2* IQFISH staining protocol steps.

Step	Reagent	Time and temperature
Dewax	Clearify™ (clearing agent)	10 minutes, 38 °C
Target retrieval	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minutes, 97 °C
Wash	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 x 3 minutes, 32 °C
Digestion*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minutes, 15 minutes or 20 minutes
Drying		15 minutes, 45 °C
Denaturation		10 minutes, 66 °C
Hybridization	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)	75 minutes, 45 °C
Stringent wash	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minutes, 61 °C

* Three validated pepsin digestion times can be chosen using the *HER2* IQFISH protocols stated above.

If no further ISH stainings are imminent, transfer all reagents to the recommended storage temperatures.

B.4. Post-staining procedure

Unload slides and apply up to 30 µL of Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) containing DAPI to the target area of the slide. The tissue section must be completely covered by Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Apply a glass coverslip.

NOTE: Slides may be read after 15 minutes or within 7 days after mounting. However, fading occurs if slides are exposed to light or high temperatures. To minimize fading, store slides in the dark at –18-8 °C.

Quality Control - Gastric

1. Signals must be bright, distinct and easy to evaluate.
2. Normal cells allow for an internal control of the staining run.
 - Normal cells should have 1-2 clearly visible green signals indicating that the CEN-17 PNA probe has successfully hybridized to the centromeric region of chromosome 17.
 - Normal cells should also have 1-2 clearly visible red signals indicating that the *HER2* DNA probe has successfully hybridized to the *HER2* gene(s).
 - Due to tissue sectioning, some normal cells will have less than the expected two signals of each color.
 - Failure to detect signals in normal cells indicates assay failure, and results should be considered invalid.

Gastric Cancer

3. Nuclear morphology must be intact when evaluated using a DAPI filter. Numerous ghost-like cells and a general poor nuclear morphology indicate over-digestion of the specimen, resulting in loss or fragmentation of signals. Such specimens should be considered invalid.
4. A minimum of 20 tumor cells must be assessable.
5. Differences in tissue fixation, processing, and embedding in the user's laboratory may produce variability in results, necessitating regular evaluation of in-house controls.

Interpretation of Staining - Gastric

Assessable tissue

Locate the tumor within the context of the H&E stained slide and evaluate the same area on the FISH stained slide (in the DAPI filter). Only specimens from patients with gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma should be analyzed. In cases with intestinal metaplasia and adenocarcinoma in the same specimen, only the carcinoma component should be scored. Avoid areas of heavy inflammation, necrosis and areas where the nuclear borders are ambiguous. Do not include nuclei that require subjective judgment. Do not include nuclei with weak signal intensity and non-specific or high background.

Begin with a microscope evaluation of the complete FISH stained section and the area assigned on the H&E section, respectively. Before enumeration of the FISH stained section, note the overall signal distribution (homogenous or heterogeneous) on the signal enumeration sheet. In case of heterogeneous distribution, note whether focal amplification or single cell amplification (mosaic) is present.

1) Homogenous signal distribution

In case the signal distribution is homogenous, enumerate the number of chromosome centromeres (green signals) and the number of *HER2* genes (red signals) respectively, from 20 cells in 1-2 representative tumor areas.

2) Heterogeneous signal distribution

In case the signal distribution is heterogeneous, enumerate a total of 20 cells from selected areas as specified below:

A) If focal amplification exists, areas with amplified cells should be selected.

B) If mosaic distribution or amplified, polysomal and disomal cells are present, count in areas with amplified cells. Within these areas, not only amplified cells but also adjacent non-amplified cells should be counted for a total of 20 cells.

If possible, do not select overlapping areas.

Disregard staining of bacterial DNA

A number of specialized cells (mast cells and macrophages), present interspersed in the gastric tissue, exhibit a high level of staining by the *HER2* probe due to presence of bacterial DNA. This results in highly red fluorescent cells that are clearly distinct from tumor cells with high *HER2* gene amplification.

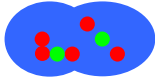

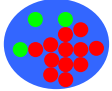

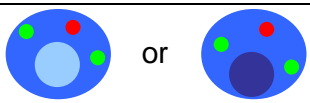

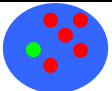


Signal enumeration

When an area has been selected for signal evaluation, begin analysis in one of the 20 adjacent chosen nuclei and then count in a cell-by-cell fashion only leaving out nuclei that do not meet the quality criteria. Locate the tumor within the context of the H&E stained slide and evaluate the same area on the FISH stained slide. Scan the entire stained slide to account for possible heterogeneity. Select an area having good nuclei distribution. Begin analysis in the upper left quadrant of the selected area and, scanning from left to right, count the number of signals within the nuclear boundary of each evaluated nucleus according to the guidelines below (see also Appendix 5).

- Focus up and down to find all of the signals in the individual nucleus
- Count two signals that are the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of the signal as only one signal. The distance has to be at least equal to the diameter of one normal-sized signal in order to count two individual signals. When the distance between two signals is less than the diameter of a signal it is counted as one.
- In nuclei with high levels of *HER2* gene amplification, the *HER2* signals may be positioned very close to each other forming a cluster of signals. In these cases the number of *HER2* signals cannot be counted, but must be estimated. Special attention must be paid to the green signals, as clusters of red *HER2* signals can cover the green signals making them impossible to see. In case of doubt, please check the green signals using a specific FITC filter.

Do not score nuclei without signals or with signals of only one color. Score only those nuclei with one or more FISH signals of each color.

Signal counting guide

1		Do not count. Nuclei are overlapping, not all areas of nuclei are visible
2		Two green signals, do not score nuclei with signals of only one color
3		Count as 3 green and 12 red signals (cluster estimation)
4		Count as 1 green and 1 red signal. Two signals of the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of one signal are counted as one
5		Do not count (over- or underdigested nuclei). Missing signals in the centre of nuclei (donut-shaped nuclei).
6		Count as 2 green and 3 red signals. Two signals of the same size and separated by a distance equal to or less than the diameter of one signal are counted as one
7		Count as 1 green and 5 red signals
8		Count as 3 green (1 green out of focus) and 3 red signals
9		Cluster of red signals hiding green signals, check the green signals with a specific FITC filter, or do not count

Record counts in a table as shown in Appendix 3 and 4.

Count 20 nuclei per tissue specimen, when possible from distinct tumor areas.

Calculate the *HER2*/CEN-17 ratio by dividing the total number of red *HER2* signals by the total number of green CEN-17 signals.

Specimens with a *HER2*/CEN-17 ratio above or equal to 2 should be considered *HER2* gene amplified (29).

Results at or near the cut-off (1.8-2.2) should be interpreted with caution.

If the ratio is borderline (1.8-2.2), count 40 different nuclei and calculate the ratio for the 40 nuclei. If the enumeration continues to be borderline, the result of the second evaluation is valid. If available, the immunohistochemical staining of *HER2* should be included for better orientation during the second enumeration.

In case of doubt, the specimen slide should be re-scored. For borderline cases a consultation between the pathologist and the treating physician is warranted.

Limitations - Gastric

1. For automated use on Dako Omnis instruments, only.
2. Specialized training is required for tissue and slide preparation and for IQFISH staining interpretation. Interpretations of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) stains should not be performed by individuals with color vision deficiency.
3. FISH results are dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may influence on probe hybridization. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.

Performance Characteristics - Gastric

Hybridization efficiency

Hybridization efficiency of *HER2* IQFISH pharmDx™ was investigated using 180 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections tested at three study sites. All 180 tissue sections could be enumerated in accordance with product enumeration guidelines. The hybridization efficiency was 100%.

The *HER2*/CEN-17 ratios calculated and used in the performance characteristics studies are based on counting signals in 20 nuclei using the scoring guidelines given in the Interpretation of Staining section of this Instruction for Use.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was investigated using 20 different gastric cancer adenocarcinoma specimens (10 samples with amplified *HER2* gene status and 10 non-amplified samples). The ratio between the number of *HER2* signals and CEN-17 signals was calculated based on counting signals in 20 nuclei from normal cells within the tissue sample. The *HER2*/CEN-17 ratio for the 20 gastric cancer adenocarcinoma tissue specimens was between 0.94 and 1.19.

Analytical specificity

The *HER2* DNA probes in the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) have been end-sequenced and mapped to confirm a total coverage of 218 kb including the *HER2* gene.

The CEN-17 PNA probes in the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) have been tested individually and in combination to confirm their specific hybridization to the centromeric region of chromosome 17.

To exclude cross-hybridization to chromosomes other than chromosome 17, studies were performed on metaphase spreads according to standard Dako QC procedures. A total of 275 metaphase spreads with distinct signals were evaluated for specific hybridization of the *HER2* DNA and CEN-17 PNA probe mixes. In all 275 cases, the hybridization was specific for chromosome 17. No cross-hybridization to loci on other chromosomes was observed in any of the 275 cases. Probe specificity was then 100% (275 of 275).

To measure the IQFISH assay's ability to solely identify the target substances *HER2* and CEN-17 without interference from other substances studies were performed on gastric adenocarcinoma specimens by omitting the *HER2* and CEN-17 probes from the hybridization mixture and only using the hybridization buffer. A total of 20 specimens were evaluated for presence of signals not related to the probe mix. No detection of other

chromosome targets or interference with closely related substances was observed in any of the 20 specimens.

Robustness studies

The robustness of the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay was tested by varying PNA probe concentration, target retrieval time, pepsin incubation time, denaturation time, hybridization time, and stringent wash time and temperature. The different parameters were tested on three different FFPE gastric adenocarcinoma cancer tissue specimens and two FFPE tissue samples from gastroesophageal junction (GEJ) (both amplified and non-amplified tissue specimens were represented in each group).

All parameters were tested both below and above standard protocol settings with the exception of PNA probe concentration and stringent wash temperature in which the standard protocol setting was included in the setup.

The test parameters were:

PNA probe concentration: Tested at 100% and +/-17%.

Target retrieval time: Tested at 13 min 45 s and 16 min 15 s.

Pepsin incubation time: Tested at 14 min 45 s and 16 min 15 s.

Denaturation time: Tested at 9 min 45 s and 10 min 45 s.

Hybridization time: Tested at 70 min and 80 min.

Stringent wash time: Tested at 8 min 45 s and 11 min 15 s.

Stringent wash temp.: Tested at 59 °C, 61 °C and 63 °C.

The three PNA probe concentrations were assessed in a fractionated Design of Experiment (JMP tool, SAS), which was performed with 12 different staining protocols as indicated in Table 12.

Table 12. Twelve different staining protocols used in the robustness study.

Robustness Protocol no.	Test parameter						
	Target retrieval time (min)	Pepsin time (min)	Denaturation time (min)	Hybridization time (min)	Stringent wash time (min)	Stringent wash temp (°C)	PNA conc. In probe mix
1	16.25	16.25	9.75	80	8.75	59	83%
2	13.75	14.75	10.75	70	8.75	59	100%
3	16.25	14.75	9.75	70	8.75	63	100%
4	13.75	14.75	10.75	80	8.75	61	83%
5	13.75	14.75	9.75	80	11.25	59	117%
6	13.75	16.25	10.75	70	11.25	63	83%
7	13.75	16.25	10.75	70	11.25	63	100%
8	16.25	14.75	9.75	70	11.25	61	83%
9	13.75	16.25	9.75	70	8.75	61	117%
10	16.25	16.25	10.75	70	11.25	59	117%
11	16.25	16.25	10.75	80	11.25	61	100%
12	16.25	14.75	10.75	80	8.75	63	117%

All five tissue specimens were stained using all 12 protocols.

The readout for the robustness study was signal intensity and morphology quality. All protocols produced staining in all tissue specimens (60 in total) with signals that were bright, distinct and easy to evaluate, thus suitable for signal enumeration.

Furthermore, the effect of tissue thickness on the *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay results was tested by varying the section thickness of FFPE gastric cancer tissue specimens.

A total of six consecutive sections of gastric adenocarcinoma specimens with different thickness (2, 3, 4, 5, 6, and 7 µm) were tested with *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). The average coefficient of variance of the *HER2*/CEN-17 ratio was 3.9% (ranging from 3.2% to 5.0%).

Reproducibility

The within laboratory day-to-day and lot-to-lot reproducibility were tested using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). The study was designed as an internal, blinded, randomized study of *HER2*/CEN-17 ratios using sections from eight different formalin-fixed, paraffin-embedded gastric cancer specimens including gastroesophageal junction (GEJ) with different levels of *HER2* gene amplification. The eight specimens had been tested with HercepTest™ and represented two specimens with *HER2* IHC 0/1+, two specimens with *HER2* IHC 2+, two specimens with *HER2* IHC 3+, and two specimens with pre-determined *HER2*/CEN-17 FISH ratio between 1.5 and 2.5 obtained using *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731). Each specimen was stained with three different lots of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) on five non-consecutive days. A total of 240 tissue stainings were processed for the entire study as each combination was stained in duplicates. Variations in the ratio between days and lots are illustrated in Figure 8. Data were analyzed using Box-Cox transformation via a Random Effect Model to obtain data variance homogeneity. The total coefficient of variation was estimated to be 6.5% and it was found that day and lot variation contributed with 0.7% and 0.8%, respectively.

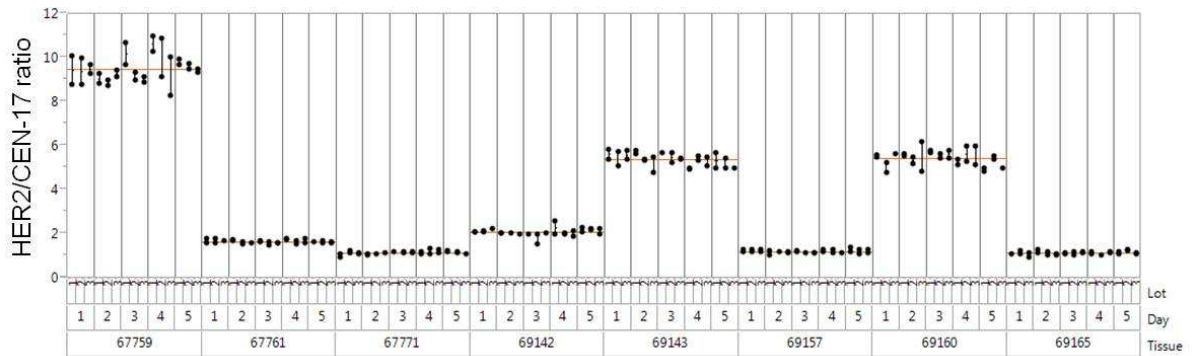


Figure 8. *HER2/CEN-17* ratios obtained in a within laboratory reproducibility study on *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), including lot-to-lot and day-to-day reproducibility endpoints. The mean value for each tissue specimen is shown with a horizontal line.

Additionally, the day-to-day and site-to-site reproducibility of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) were tested in an external three-site (one site in USA and two sites in Europe), stratified and blinded study on tissue sections from 12 different formalin-fixed, paraffin-embedded gastric adenocarcinoma specimens including gastroesophageal junction (GEJ). Three specimens were *HER2* IHC 0/1+, three specimens were *HER2* IHC 2+, three specimens were *HER2* IHC 3+, and three specimens had pre-determined *HER2/CEN-17* FISH ratio between 1.5 and 2.5 obtained using HercepTest™ and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731), respectively. The specimens were stained and analyzed at the study sites. Each specimen was stained for a minimum of seven times on seven non-consecutive days and scored by one observer at each site. 314 sections were stained and included in the statistical analysis. Data were analyzed using Box-Cox transformation and variance components were calculated. The total coefficient of variance based on the upper 95% confidence limit was 24%. *HER2/CEN-17* ratio variation for day and site is presented in Figure 9.

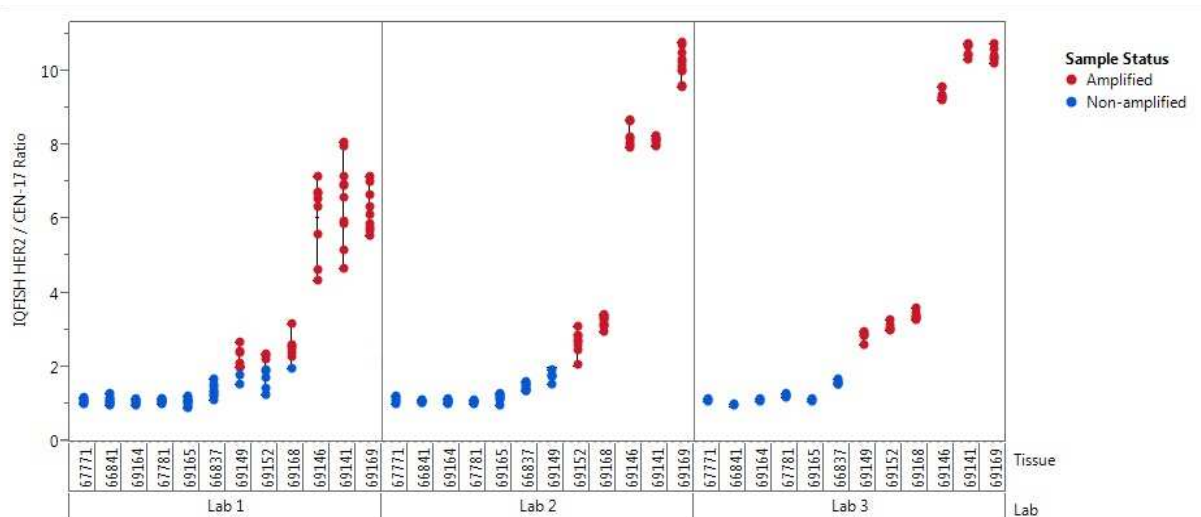


Figure 9. Variability chart of *HER2/CEN-17* ratios in non-transformed units obtained in the day-to-day and site-to-site reproducibility study of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) on gastric cancer tissue specimens.

The *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) assay was tested for observer-to-observer reproducibility as part of the internally conducted method comparison study using three

observers to score the stained specimens independently. Reproducibility was tested on 139 different gastric adenocarcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Data were analyzed using Box-Cox transformation. The average coefficient of variation for observer-to-observer was 18%. Gastric adenocarcinoma specimens consisted of 96.4% resection and 5.6% biopsy specimens. 81.3% of the specimens were obtained from stomach and 18.7% were from gastroesophageal junction.

Repeatability

The within laboratory repeatability of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) was tested using consecutive sections from eight gastric adenocarcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Tissues were tested in duplicate on five non-consecutive days with three different lots in a total of 240 slides (120 sections in duplicate). The Random Effects Model was used for data analysis and resulted in variance attributable to days and lots (see internal reproducibility study above). The residual variance accounts for the variance between replicas and thereby repeatability. The upper 95% confidence limit for the repeatability coefficient of variation was 7.1%.

Method comparison study

Comparison of *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) with *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731)

The study included 140 gastric cancer specimens consisting of the different gastric adenocarcinoma tissue types, i.e. stomach or gastroesophageal junction (GEJ) and resections or biopsies with homogeneous or heterogeneous (focal or mosaic) signal distribution as shown in Table 13.

Table 13. Distribution of specimens in gastric cancer type (stomach or GEJ), signal distribution category (homogeneous or heterogeneous), and tissue type (resection or biopsy).

Gastric cancer type	Number of specimens	Signal distribution	Number of specimens	Tissue type	Number of specimens
Stomach	113	Homogeneous	58	Resection	134
Gastro-esophageal junction (GEJ)	27	Heterogeneous - focal	61	Biopsy	6
		Heterogeneous - mosaic	21		
Total	140	Total	140	Total	140

The specimens consisted of 76 *HER2*-non-amplified cases and 64 *HER2*-amplified cases with known HercepTest™ score as shown in Table 14.

Table 14. Distribution of specimens based on HercepTest™ score and *HER2* FISH score obtained with *HER2* FISH pharmDx™ Kit (K5731).

HercepTest™ staining score	0	1+	2+	3+	Total
n	39	14	45	42	140
<i>HER2</i> FISH status					
Amplified	4	1	19	40	64
Non-amplified	35	13	26	2	76
Total FISH-tested samples	39	14	45	42	140

Results of the cross tabulation of *HER2* status obtained by the two assays with calculation of overall percent agreement (OPA), positive percent agreement (PPA), and negative percent agreement (NPA) are shown in Table 15. Correlation between *HER2*/CEN-17 ratios using the two assays is shown in Figure 10.

Table 15. Cross tabulation of *HER2* gene status obtained using *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731) and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		<i>HER2</i> gene status (K5731)		Total
		Non-amplified	Amplified	
<i>HER2</i> gene status (Dako Omnis)	Non-amplified	76	1	77
	Amplified	0	63	63
Total		76	64	140
OPA: 99.3%				
PPA: 98.4%				
NPA: 100%				

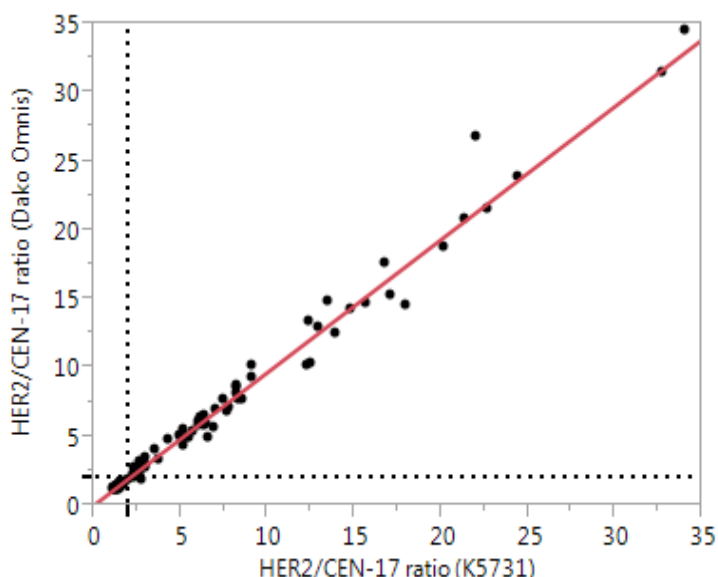


Figure 10. Correlation between *HER2*/CEN-17 ratios from *HER2* FISH pharmDx™ (Dako Omnis) and *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) on 140 gastric cancer specimens (linear fit: $y = 0.06 + 0.97x$; $R^2 = 0.97$. Weighted with inverse variance to allow for linear fit).

The 95% confidence interval for the average difference between the two staining methods at *HER2*/CEN-17 ratio =2 was found to be [0.007; 0.022]. This means a difference higher than 2% is not expected.

Clinical data

The clinical safety and efficacy of trastuzumab (Herceptin™) has been demonstrated in the BO18255 study (the ToGA trial “An open-label, randomized, multicenter, phase III study of trastuzumab in combination with cisplatin and a fluoropyrimidine (capecitabine or 5-Fluorouracil) (FC+H) versus chemotherapy (FC) alone as first-line therapy in patients with *HER2* positive advanced gastric cancer”) (28). The study was designed as an open labeled, randomized, multicenter phase III study in *HER2*-positive patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. In the BO18255 study *HER2* positivity was defined as being either IHC-positive (3+) using HercepTest™ (Dako) and/or FISH positive (*HER2*/CEN-17 ≥ 2.0) using *HER2* FISH pharmDx™ Kit (Dako). After inclusion in the study the patients were randomized to receive chemotherapy (5-FU or capecitabine and cisplatin) or chemotherapy plus trastuzumab.

The main efficacy outcome measure was overall survival (OS) analyzed by stratified log rank test. The final OS analysis based on 351 deaths was statistically significant (nominal significance level of 0.0193). An updated OS analysis was also conducted at one year after the final analysis. The median overall survival of 13.5 months on the Herceptin™ plus chemotherapy arm was significantly longer compared to 11.0 month median overall survival on the chemotherapy alone arm. The efficacy results of both the final and the updated analyses are summarized in Table 16 and Figure 11.

Table 16. Overall Survival in Intention to Treat (ITT) Population.

	FC Arm N= 296	FC + H Arm N=298
Final Overall Survival		
No. Deaths (%)	184 (62.2%)	167 (56.0%)
Median	11.0	13.5
95% CI (mos.)	(9.4, 12.5)	(11.7, 15.7)
Hazard Ratio	0.73	
95% CI	(0.60, 0.91)	
p-value*, two-sided	0.0038*	
Updated Overall Survival		
No. Deaths (%)	227 (76.7%)	221 (74.2%)
Median	11.7	13.1
95% CI (mos.)	(10.3, 13.0)	(11.9, 15.1)
Hazard Ratio	0.80	
95% CI	(0.67, 0.97)	

*Comparing with the nominal significance level of 0.0193

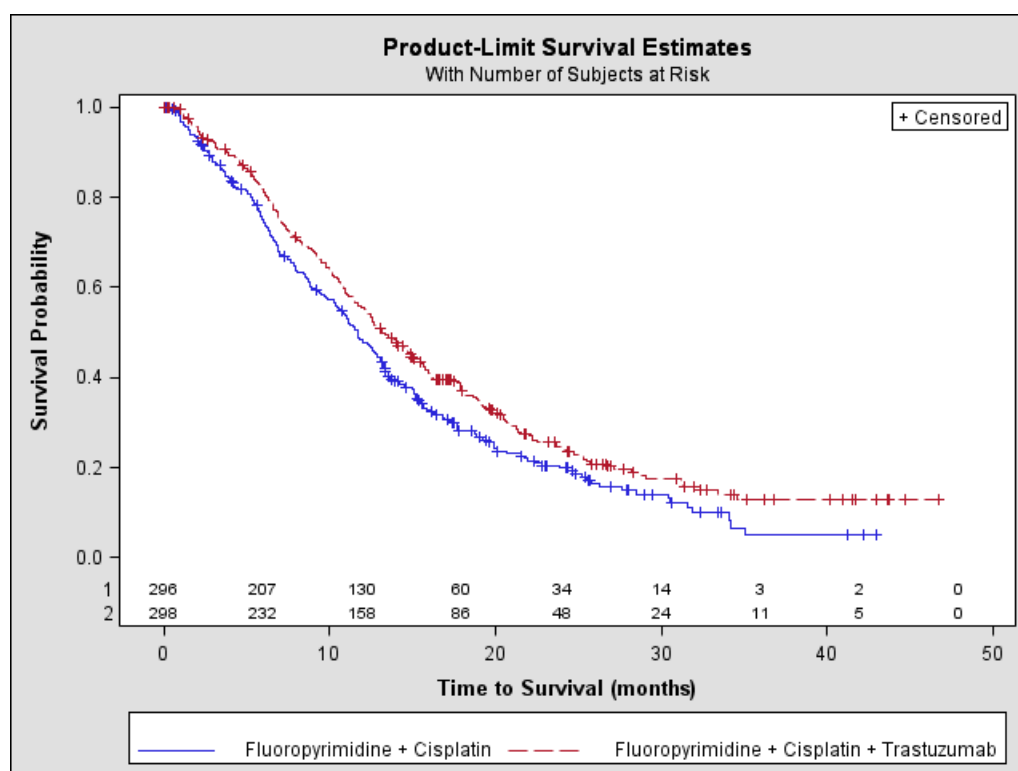


Figure 11. Updated Overall Survival in Patients with Metastatic Gastric Cancer

An exploratory analysis of OS based on gene amplification (FISH) and protein-overexpression (IHC) testing is summarized in Table 17.

Table 17. Exploratory Analyses by HER2 Status with Updated Overall Survival Results.

	FC N=296^a	FC+H N=298^b
FISH+ / IHC 0, 1+ subgroup (N=133)		
No. Deaths / n (%)	57/71 (80.3%)	56/62 (90.3%)
Median OS Duration (mos.)	8.8	8.3
95% CI (mos.)	(6.4, 11.7)	(6.2, 10.7)
Hazard ratio (95% CI)	1.33 (0.92, 1.92)	
FISH+ / IHC2+ subgroup (N=160)		
No. Deaths / n (%)	65/80 (81%)	64/80 (80%)
Median OS Duration (mos.)	10.8	12.3
95% CI (mos.)	(6.8, 12.8)	(9.5, 15.7)
Hazard ratio (95% CI)	0.78 (0.55, 1.10)	
FISH+ or FISH-/IHC3+^c subgroup (N=294)		
No. Deaths / n (%)	104/143 (73%)	96/151 (64%)
Median OS Duration (mos.)	13.2	18.0
95% CI (mos.)	(11.5, 15.2)	(15.5, 21.2)
Hazard ratio (95% CI)	0.66 (0.5, 0.87)	

Median survival was estimated from Kaplan-Meier curves.

^a Two patients on FC arm who were FISH+ but IHC status unknown were excluded from the analyses.

^b Five patients on Herceptin™ arm who were FISH+ but IHC status unknown were excluded from the analyses.

^c Includes 6 patients on chemotherapy arm, 10 patients on Herceptin™ arm with FISH-, IHC3+ and 8 patients on chemotherapy arm, 8 patients on Herceptin™ arm with FISH status unknown, IHC3+.

Troubleshooting - Gastric

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No signals or weak signals	<p>1a. Reagents have been exposed to high temperatures during transport or storage</p> <p>1b. Microscope not functioning properly</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inappropriate filter set - Improper lamp - Mercury lamp too old - Dirty and/or cracked collector lenses - Unsuitable immersion oil <p>1c. Faded signals</p> <p>1d. Buffers identified incorrectly</p>	<p>1a. Check storage conditions. Ensure that dry ice was present when the IQISH probe mix and pepsin shipments were received. Ensure that the reagents have been stored at as specified.</p> <p>1b. Check the microscope and ensure that the used filters are suitable for use with the probe mix fluorochromes, and that the mercury lamp is correct and has not been used beyond expected lifetime (see Appendix 5). In case of doubt, please contact your local microscope vendor.</p> <p>1c. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light sources.</p> <p>1d. Replace bulk buffers and ensure correct registration (at Workstation) and identification (at Touch Screen) of bulk buffers. Consult Dako Omnis Basic User Guide for further details. Please note: ISH Pre-Treatment Solution is green and ISH Stringent Wash Buffer is yellow.</p>
2. Areas without signal	2. Air bubbles caught during mounting	2. Avoid air bubbles. If observed, gently tap them away using forceps.
3. Excessive background staining	<p>3a. Inappropriate tissue fixation</p> <p>3b. Prolonged exposure of hybridized section to strong light</p>	<p>3a. Ensure that only formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are used.</p> <p>3b. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light.</p>
4. Poor tissue morphology	4a. Incorrect Pepsin treatment	4a. Change to another of the three different staining protocols. Ensure that the ISH Pepsin is stored at the correct temperature.

Gastric Cancer

Problem	Probable Cause	Suggested Action
	4b. Too long Pepsin treatment or very thin section thickness may cause ghost cells or donut cells to appear.	4b. Attempt a staining protocol with shorter pepsin incubation time. Ensure that the section thickness is 3-6 μm .
5. High level of green auto fluorescence on slide including areas without FFPE tissue	5. Use of expired or non-recommended glass slides.	5. Choose glass slides as specified. Ensure that the glass slides have not passed expiry date.

NOTE: If the problem cannot be attributed to any of the above causes, or if the suggested corrective action fails to resolve the problem, please call Dako Technical Services for further assistance.

Appendix 3 - Gastric

**HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code GM333
Scoring Scheme**

Date of the run: _____

Staining Run Log ID: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Lot: _____

Specimen ID: _____

Characterization of signal distribution in tissue:

Homogeneous:

Heterogeneous – Focal: or Heterogeneous – Mosaic:

Count signals in 20 nuclei					
Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)	Nucleus No.	HER2 score (red)	CEN-17 score (green)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total (1-10)			Total (11-20)		

For determination of the *HER2*/CEN-17 ratio, count the number of *HER2* signals and the number of CEN-17 signals in the same 20 nuclei and divide the total number of *HER2* signals by the total number of CEN-17 signals. If the *HER2*/CEN-17 ratio is borderline (1.8–2.2), count 40 different nuclei and recalculate the ratio for the 40 nuclei (refer to Recount Scoring Scheme, Appendix 4).

A ratio at or near the cut-off (1.8-2.2) should be interpreted with caution (see counting guide).

	<i>HER2</i>	CEN-17	<i>HER2</i> /CEN-17 ratio
Total score (1-20)			

- Ratio < 2: *HER2* gene amplification was not observed
- Ratio ≥ 2: *HER2* gene amplification was observed

Date and signature, Technician: _____

Date and signature, Pathologist: _____

For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.

Appendix 4 - Gastric

**HER2 IQFISH pharmDx™, Code GM333
Recount Scoring Scheme**

Date of the run: _____

Staining Run Log ID: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Lot: _____

Specimen ID: _____

Signals in additional 40 nuclei (1-40)											
Nucleus no.	HER2 (red)	CEN17 (green)	Nucleus no.	HER2 (red)	CEN-17 (green)	Nucleus no.	HER2 (red)	CEN-17 (green)	Nucleus no.	HER2 (red)	CEN-17 (green)
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Total (1-10)			Total (11-20)			Total (21-30)			Total (31-40)		

For determination of the *HER2*/CEN-17 ratio, count the number of *HER2* signals and the number of CEN-17 signals in the same 40 nuclei and divide the total number of *HER2* signals by the total number of CEN-17 signals. **Report Total Score from the 1-40 nuclei in the table below.**

	<i>HER2</i>	<i>CEN-17</i>	<i>HER2/CEN-17 ratio</i>
Total score (1-40)			

- Ratio < 2: *HER2* gene amplification was not observed
- Ratio ≥ 2: *HER2* gene amplification was observed

Date and signature, Technician: _____

Date and signature, Pathologist: _____

For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.

Appendix 5 - Gastric

HER2 IQFISH pharmDx™, Code GM333 Fluorescence Microscope Specifications

Dako recommends the following equipment for use with *HER2 IQFISH pharmDx™*, (Dako Omnis), GM333:

1. Microscope type

- Epifluorescence microscope

2. Lamp

- 100 watt mercury lamp (keep record of burning time)

3. Objectives

- For screening of the tissue, oil immersion 16X or 20X objectives are applicable
- For high power magnification and for enumeration of signals, only oil immersion objectives, e.g. 100X are recommended

4. Filters

Filters are individually designed for specific fluorochromes and must be chosen accordingly. Dako recommends the use of a specific DAPI filter in combination with a high quality Texas Red/FITC double filter.

- DAPI filter, e.g. Chroma filter # 31000
- Texas Red/FITC double filter, e.g. Omega Optical filter # XF53 or Chroma filter # 51006
- Texas Red and FITC single filters can be used for confirmation and for enumeration

Fluorochrome	Excitation Wavelength	Emission Wavelength
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filters are specific to each microscope type and the use of appropriate filters is crucial for the interpretation. If you want detailed information, please contact your microscope provider or your Dako representative.

5. Oil

- Non-fluorescing oil

Precautions

- A 50 watt mercury lamp is not recommended
- Rhodamine filters cannot be used
- Triple filters are not recommended

A non-optimized microscope may cause problems when reading the fluorescent signals. It is important that the light source has not expired and that it is properly aligned and focused.

Customers should monitor and follow the manufacturer's recommendations for the mercury lamp. The microscope should be maintained and the mercury lamp should be in alignment prior to interpreting results.

An effort should be made to expose the sample to as little of the excitation light as possible in order to minimize fading of the fluorescence.

We recommend that you discuss the set-up of your particular microscope with the manufacturer before starting the fluorescence in situ hybridization, or refer to the literature.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro*.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une sonde d'hybridation pour le test automatisé d'hybridation *in situ* en fluorescence directe (FISH) sur les instruments Dako Omnis. Utilisée avec les réactifs accessoires, elle permet de déterminer quantitativement l'amplification du gène *HER2* dans des échantillons de tissus mammaires cancéreux inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE) et dans des échantillons FFPE de patients atteints d'adénocarcinome de l'estomac, y compris de la jonction gastro-œsophagienne.

HER2 IQFISH pharmDx™ est indiqué en supplément du test HercepTest™ pour l'évaluation des patients chez lesquels un traitement par Herceptin™ (trastuzumab) est envisagé (voir la notice de Herceptin™).

Dans le cas de patientes atteintes de cancer du sein, les résultats obtenus avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) sont à utiliser conjointement aux informations pathologiques cliniques permettant actuellement d'évaluer le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein de stade II, à ganglions positifs.

Dans ce document, le terme "cancer de l'estomac" est également utilisé pour désigner un adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne.

Pour l'application au cancer du sein, consulter les pages 53 à 77.

Pour l'application au cancer de l'estomac, consulter les pages 78 à 104.

Important : Noter les différences qui existent entre le tissu d'un cancer du sein et celui d'un cancer de l'estomac, en particulier aux sections Interprétation de la coloration.

Résumé et explication – Sein

Le gène humain *HER2* (également connu sous le nom de *ERBB2* ou *NEU*) se trouve sur le chromosome 17 et code la protéine HER2 ou p185^{HER2}. La protéine HER2 est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase possédant une homologie avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR ou HER1) (1-2). Le gène *HER2* est présent en deux copies dans toutes les cellules diploïdes normales.

Chez certaines patientes atteintes d'un cancer du sein, le gène *HER2* est amplifié dans le cadre du processus de transformation maligne et de progression de la tumeur (3-8). L'amplification du gène *HER2* entraîne généralement une surexpression de la protéine HER2 à la surface des cellules de cancer du sein (9).

L'amplification du gène *HER2* et/ou la surexpression de sa protéine ont été démontrées dans 20 à 25% des cas de cancer du sein (10). Cette régulation en amont est associée à un mauvais pronostic, un risque accru de récurrence et une survie écourtée. Plusieurs études ont montré que le statut de HER2 est en corrélation avec la sensibilité ou la résistance à certains régimes de chimiothérapie (11).

La démonstration d'une forte surexpression de la protéine HER2 ou de l'amplification du gène *HER2* est essentielle pour commencer un traitement par Herceptin™, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine HER2. Des études cliniques ont montré que ce sont les patients avec des tumeurs dans lesquelles la protéine HER2 est surexprimée et/ou le gène *HER2* est amplifié qui bénéficient le plus de Herceptin™ (12).

Ce produit (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)) est un mélange de sondes IQISH pour l'amplification du gène *HER2* en vue d'une détection automatisée par la méthode FISH directe. Ce produit doit être utilisé avec les réactifs accessoires indiqués sur le système Dako Omnis et il est dérivé du test d'amplification du gène *HER2* réalisé manuellement, *HER2* IQFISH pharmDx™, réf. K5731.

Principe de la procédure - Sein

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est un mélange de sondes IQISH constitué d'un mélange de sondes ADN marquées au Texas Red couvrant une région de 218 kb incluant le gène *HER2* sur le chromosome 17, et d'un mélange de sondes (13) PNA (acide nucléique peptidique) marquées à la fluorescéine ciblant la région centromérique du chromosome 17 (CEN-17). L'hybridation spécifique des deux cibles entraîne la formation d'un signal rouge fluorescent distinct sur chaque locus du gène *HER2* et d'un signal vert fluorescent distinct sur chaque centromère du chromosome 17.

L'analyse de l'amplification du gène *HER2* avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une méthode entièrement automatisée sur l'instrument Dako Omnis. Trois différents protocoles de coloration FISH validés pour *HER2* peuvent être sélectionnés dans le logiciel de la station de travail Dako Link Omnis. Les protocoles diffèrent uniquement par le temps de digestion par la pepsine. Par conséquent, une digestion par la pepsine pendant 10 min (protocole court), 15 min (protocole moyen) ou 20 min (protocole long) peut être choisie (voir ci-dessous). Le protocole moyen est recommandé pour l'analyse initiale.

Après coloration sur l'appareil Dako Omnis, les échantillons sont montés avec du Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et recouverts d'une lamelle de protection. À l'aide d'un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés (voir Annexe 2), les cellules tumorales sont localisées et une numération des signaux rouges (*HER2*) et verts (CEN-17) est effectuée. Puis, le rapport *HER2*/CEN-17 est calculé. Les cellules normales dans la coupe de tissu analysée servent de contrôle positif interne de la coloration.

Pour plus d'informations, voir la section Interprétation de la coloration.

Consulter le(s) Guide(s) d'utilisation Dako Omnis pour obtenir des instructions détaillées sur le chargement et le déchargement des lames, les couvercles HIS (Dako Omnis), les réactifs, les liquides de rinçage en gros volume et les déchets.

Réactifs - Sein

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et les réactifs accessoires peuvent être commandés séparément.

Matériel fourni

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) : 1,6 mL, prêt à l'emploi, mélange de sondes ADN pour *HER2* marquées au Texas Red et de sondes PNA pour CEN-17 marquées à la fluorescéine, fourni dans le tampon d'hybridation IQISH.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est expédié sur de la neige carbonique. **Afin de s'assurer que le réactif n'a pas été exposé à des températures élevées pendant le transport, il doit rester de la neige carbonique dans l'emballage à la réception.** Les flacons de réactifs dont le contenu est décongelé doivent toujours être conservés et manipulés verticalement.

Le flacon de réactif contient une bille en métal plaqué or qui sert au mélange du réactif à l'aide du dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device (voir le Guide d'utilisation du dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device). Il est important que le réactif soit soigneusement mélangé avant le chargement sur le Dako Omnis.

Matériels requis mais non fournis

Réactifs accessoires

Les réactifs suivants doivent être chargés sur l'instrument Dako Omnis pour pouvoir réaliser une analyse de l'amplification du gène *HER2* avec *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) :

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) : 175 mL, concentrée 20x ; à diluer à 1:20 dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume 3,5 L Dako Omnis (Réf. GC109). Ce produit contient un agent antimicrobien et une teinte verte inerte pour en faciliter l'identification et l'utilisation.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) : 14 mL, éthanol à 96% (prêt à l'emploi).

ISH Pepsin (Dako Omnis) : 7 mL, solution de pepsine A (prête à l'emploi), pH 2,0 ; contient un agent stabilisateur et un agent antimicrobien. La solution Pepsin est expédiée sur de la neige carbonique. **Afin de s'assurer que le réactif n'a pas été exposé à des températures élevées pendant le transport, il doit rester de la neige carbonique dans l'emballage à la réception.**

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) : 175 mL d'une solution saline de citrate de sodium concentrée 20x ; à diluer à 1:20 dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume 3,5 L Dako Omnis (Réf. GC109). Ce produit contient un agent antimicrobien, un détergent et une teinte jaune inerte pour en faciliter l'identification et l'utilisation.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) : 0,8 mL, Fluorescence Mounting Medium (prêt à l'emploi) contenant du DAPI.

Bien que les réactifs ci-dessus ne soient pas fournis avec *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis), ils sont brièvement décrits ci-dessous. Consulter les instructions d'utilisation de chaque dispositif pour de plus amples informations.

Réactifs et dispositifs supplémentaires

Dako Omnis, réf. G1100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), réf. GC807

Clearify™, réf. GC810

Dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device, réf. GC116

ISH Lid, réf. GC102

ISH Cleaning Solution, réf. GC207

Lamelles de protection pour le montage (24 mm x 50 mm)

Consulter le Guide d'utilisation de base et le Guide d'utilisation avancée pour l'utilisation de réactifs et dispositifs supplémentaires.

Microscope et accessoires

Filtres pour microscope à fluorescence : double filtre DAPI et FITC/Texas Red, ou filtres simples FITC et Texas Red (consulter l'Annexe 2 pour plus d'informations). L'utilisation d'un filtre DAPI à fort grossissement affecte négativement l'intensité du signal. Les temps d'exposition longs doivent être évités.

Il est recommandé d'utiliser un microscope à fluorescence équipé d'une lampe à mercure de 100 watts comme source de lumière. L'utilisation d'autres sources de lumière n'est pas recommandée pour ces filtres.

Boîte de rangement des lames de microscope (plateau en carton pour 20 lames avec couvercle à charnière ou similaire).

Précautions - Sein

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) contient ≥ 10 à $< 25\%$ de carbonate d'éthylène et ≥ 3 à < 5 de chlorure de sodium. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) comporte l'étiquette suivante :



Attention

H319

P280

P264

P305 + P351 + P338

Provoque une sévère irritation des yeux.

Porter un équipement de protection des yeux ou du visage.

Se laver les mains soigneusement après manipulation.

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit.

Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.

4. Les échantillons tissulaires, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux qui y ont été exposés, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection, et doivent être éliminés avec toutes les précautions d'emploi nécessaires (14). Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.
5. Minimiser tout risque de contamination microbienne des réactifs afin d'éviter des résultats erronés.
6. Toute modification des méthodes de fixation des tissus et des épaisseurs d'échantillons spécifiées peut affecter la morphologie tissulaire et/ou l'intensité du signal.
7. Le réactif a été dilué de façon optimale. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte des performances.

8. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) pour plus d'informations.
9. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation - Sein

Conserver le *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) à <-18 °C (une température de -18 °C à -25 °C est recommandée) à l'abri de la lumière. Toujours conserver le flacon de réactif décongelé en position verticale. Le réactif peut être congelé et décongelé à 10 reprises sans affecter les performances. Ne pas laisser ce composant à température ambiante.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et les réactifs accessoires : La ISH Pepsin (Dako Omnis) et le Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) peuvent être affectés s'ils sont exposés à la chaleur. Ne pas laisser ces composants à température ambiante.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et le réactif accessoire Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) peuvent être affectés en cas d'exposition à une luminosité excessive. Ne pas conserver ces éléments, ni procéder à l'analyse sous une lumière trop vive telle que la lumière directe du soleil.

Conserver les réactifs accessoires ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) et Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Conserver la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) à une température comprise entre -18 et 8 °C. Le bouchon du flacon, y compris le bouchon à charnière, doit être fermé pour tous les réactifs pendant la conservation.

Les solutions diluées (solutions de travail ISH Stringent Wash Buffer et ISH Pre-Treatment Solution) peuvent être conservées entre 2 et 8 °C pendant 30 jours.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur le récipient du réactif. Lors du stockage, le bouchon du réactif, y compris le bouchon à charnière, doit être fermé. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, la performance des réactifs doit être validée par l'utilisateur (15).

Aucun signe évident n'indique l'instabilité de ce produit. Par conséquent, il est important d'évaluer les cellules normales dans la coupe de tissu analysée. Si un profil de fluorescence inattendu et inexplicable est observé et en cas de suspicion d'un problème avec *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) ou ses réactifs accessoires, contacter le service technique Dako.

Stabilité sur l'instrument Dako Omnis

La stabilité du *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) et des réactifs accessoires (ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) et ISH Pepsin (Dako Omnis)) sur l'instrument est de 80 jours. La stabilité des produits ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) et ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) est de sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. En cas d'utilisation de réactifs périmés, l'instrument Dako Omnis affiche un message d'avertissement. Toutes les lames colorées avec le réactif périmé sont signalées comme douteuses et le journal des lames affiché sur la station de travail indique qu'un réactif périmé a été utilisé.

Préparation des échantillons - Sein

Les échantillons des biopsies, excisions ou résections doivent être manipulés de manière à préserver le tissu pour l'analyse FISH. Les méthodes standard de traitement des tissus pour un immunomarquage doivent être utilisées pour tous les échantillons (16).

Coupes incluses en paraffine

Seuls les tissus préservés dans du formol tamponné neutre et ceux inclus en paraffine conviennent à cet usage. Les échantillons doivent, par exemple, être inclus dans des blocs d'une épaisseur de 3 à 4 mm et être fixés pendant 18 à 24 heures dans du formol neutre tamponné. Les tissus sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol et de xylène à des concentrations croissantes, puis infiltrés avec de la paraffine liquide maintenue à une température ne dépassant pas 60 °C. Les tissus correctement inclus et fixés se conservent indéfiniment avant leur coupe et le montage sur lame s'ils sont conservés dans un endroit frais (entre 15 et 25 °C) (16-17). Les autres fixateurs ne conviennent pas.

Les échantillons tissulaires doivent être découpés en sections de 4 à 6 µm.

Les lames nécessaires pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2* et la vérification de la présence d'une tumeur doivent être préparées au même moment. Un minimum de deux coupes consécutives est recommandé, une coupe pour détecter la présence d'une tumeur colorée à l'hématoxyline et l'éosine (coloration H&E), et une coupe pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2*. Il est recommandé de monter les coupes de tissus sur des lames Dako FLEX IHC Microscope Slides, réf. K8020. Les lames Superfrost Plus Slides (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ) conviennent également. S'assurer que les lames en verre ne sont pas périmées. Les échantillons doivent être analysés dans les six mois après la coupe lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 25 °C.

REMARQUE : Les échantillons tissulaires doivent être placés sur le verre à l'intérieur de la zone de coloration définie pour les lames. Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour connaître les dimensions de la zone de coloration des lames.

INSTRUCTIONS D'UTILISATION - Sein

A. Préparation des réactifs - Sein

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

Le flacon de la sonde *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) contient une bille en métal plaqué or qui sert au mélange. Avant de charger le flacon sur l'instrument Dako Omnis, le réactif doit être décongelé et soigneusement mélangé car ses phases se séparent lors de la congélation.

Utiliser le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device pour mélanger la sonde.

Suivre la procédure ci-dessous pour mélanger la sonde sur le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device et consulter le Guide d'utilisation du dispositif de mélange pour plus d'informations.

1. Sortir le flacon de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) du congélateur.
2. Charger le flacon sur le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device.
3. Brancher le dispositif de mélange et s'assurer que le voyant d'état vert est allumé. Sélectionner le programme "décongélation + mélange". **Important :** Les flacons conservés à une température **inférieure** à -25 °C doivent être décongelés (seulement) avant le chargement du flacon sur le dispositif de mélange Dako Omnis et le programme "Mélange" doit être utilisé.
4. Retirer le flacon du dispositif de mélange.
5. Ouvrir le bouchon à charnière, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche (consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis).

6. Charger immédiatement le flacon sur le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) de l'instrument Dako Omnis. Si la fonction de chargement du réactif en continu est utilisée au cours du cycle de coloration, s'assurer que le temps entre le mélange et l'aspiration du flacon sur l'instrument Dako Omnis est d'au moins 10 minutes.

La sonde *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) peut être recongelée et utilisée jusqu'à 10 fois.

Veiller à toujours mélanger la sonde *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) juste avant de la charger sur l'instrument. Ne pas la secouer. La stabilité totale de ISH *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après le chargement sur l'instrument Dako Omnis, *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) doit immédiatement être ramené à une température inférieure à -18 °C (une température comprise entre -18 °C et -25 °C est recommandée).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Préparer une solution de travail en diluant au 1/20e la ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) comme suit :

1. Remplir une bouteille en gros volume Dako Omnis de 3,5 L, désignée par une étiquette bleue (tampon PT), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Vider un flacon de 175 mL de concentré de ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide en gros volume.
3. Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille de liquide en gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille de liquide en gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
4. Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille de liquide en gros volume).
5. Charger immédiatement la bouteille en gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée sur le Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). La solution diluée restante peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 30 jours. Après sortie du réfrigérateur, s'assurer que la solution diluée est équilibrée à au moins 18 °C avant le chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE : Jeter la solution diluée si elle présente un aspect trouble.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Préparer une solution de travail en diluant au 1/20ème le tampon concentré ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) comme suit :

1. Remplir une bouteille en gros volume Dako Omnis de 3,5 L, désignée par une étiquette bleue (tampon PT), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Vider un flacon de 175 mL de concentré de ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide en gros volume.
3. Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille de liquide en gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille de liquide en gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
4. Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille de liquide en gros volume).

5. Charger immédiatement la bouteille de liquide de rinçage en gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée sur le Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). La solution diluée restante peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 30 jours maximum. Après sortie du réfrigérateur, s'assurer que la solution diluée est équilibrée à au moins 18 °C avant le chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE : Jeter la solution diluée si elle présente un aspect trouble.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

La ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur l'instrument Dako Omnis, ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après la fin du cycle, la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) peut être amenée à une température de stockage (entre 2 et 8 °C) afin de préserver le temps de stabilité sur l'appareil.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

La solution ISH Pepsin (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur l'instrument Dako Omnis, s'assurer que le réactif est décongelé et ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après la fin du cycle, la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) doit être amenée à une température de stockage comprise entre -18 et 8 °C afin de préserver le temps de stabilité sur l'instrument.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Le Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) est un milieu de montage prêt à l'emploi à utiliser hors de l'instrument Dako Omnis. Amener le Fluorescence Mounting Medium à sa température de conservation (entre 2 et 8 °C) immédiatement après utilisation.

A.7 Accessoires supplémentaires

Les accessoires suivants doivent en outre être chargés sur l'instrument Dako Omnis : eau déionisée, tampon dilué Wash Buffer 20x (Dako Omnis), réf. GC807, Clearify™, réf. GC810, ISH Cleaning Solution, réf. GC207 et ISH Lid (Dako Omnis), réf. GC102 comme indiqué dans le Guide d'utilisation Dako Omnis.

B. Procédure de coloration – Sein

B.1 Remarques sur la procédure

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une sonde d'hybridation pour le test automatisé d'hybridation *in situ* en fluorescente directe (FISH) sur l'instrument Dako Omnis. Utilisée avec les réactifs accessoires GM300, GM301, GM302, GM303 et GM304 (GM304 en dehors de l'instrument), elle permet de déterminer quantitativement l'amplification du gène *HER2*. Avant l'utilisation, l'utilisateur doit lire attentivement toutes les instructions et se familiariser avec tous les composants et les précautions d'emploi.

La procédure de coloration FISH automatisée sur l'instrument Dako Omnis inclut le déparaffinage des coupes de tissus, la restauration des cibles, la digestion par la pepsine, l'hybridation et le lavage stringent. Les lames sont déchargées dans la Unloading Station (Station de

déchargement) sèche. Toutes les étapes du protocole sont pré-programmées dans le logiciel Dako Omnis.

Consulter le(s) Guide(s) d'utilisation du Dako Omnis pour obtenir des instructions sur le chargement des lames, le couvercle HIS, les réactifs, etc. Trois protocoles IQFISH validés pour *HER2* — le protocole *HER2 IQFISH Pepsin court*, le protocole *HER2 IQFISH Pepsin moyen* et le protocole *HER2 IQFISH Pepsin long*, qui diffèrent uniquement par le temps de digestion par la pepsine, sont pré-programmés dans le logiciel Dako Omnis et peuvent être sélectionnés pour chacune des cinq lames dans le portoir à lames. Cela permet d'optimiser la digestion des tissus qui peut varier en fonction des conditions pré-analytiques. Le protocole *IQFISH Pepsin moyen* est considéré comme le protocole standard. Les différents protocoles de coloration peuvent être consultés sur la station de travail Dako Link Omnis.

B.2. Procédure de pré-coloration

1. Choisir le protocole *HER2 IQFISH* à appliquer pour chaque lame à partir du logiciel de la station de travail Dako Link Omnis, sous Protocoles IQFISH.
2. Imprimer les étiquettes des lames et les apposer sur les lames de verre.
3. Placer les lames dans le portoir à lames. Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus d'informations. Un portoir à lames peut contenir une à cinq lames. Il est recommandé de colorer au moins deux lames lors d'un cycle de coloration *HER2 IQFISH*.
4. Charger le portoir à lames sur l'instrument Dako Omnis.
5. Charger le couvercle HIS (un couvercle HIS par portoir à lames) sur l'instrument Dako Omnis.
6. Vérifier que les bouteilles de liquide de rinçage en gros volume sont chargées et enregistrées par l'instrument Dako Omnis. Bouteilles de liquide de rinçage en gros volume : Clearify™ (agent d'élimination), la solution ISH Pre-Treatment Solution diluée (Dako Omnis), la solution ISH Stringent Wash Buffer diluée (Dako Omnis) et le tampon de lavage dilué (Dako Omnis).
7. Charger la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) et la solution ISH Pepsin (Dako Omnis), le *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) qui vient d'être mélangé et la ISH Cleaning Solution sur le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs). Vérifier que tous les bouchons à charnière sont ouverts.
8. Suivre les instructions qui apparaissent sur l'écran tactile et appuyer sur "Done" (Terminé) pour lancer la procédure de coloration.

B.3. Procédure de coloration

La procédure de coloration *HER2 IQFISH* sur l'instrument Dako Omnis (récapitulée dans le tableau 1) peut être suivie sur la station de travail Dako Link Omnis :

Tableau 1 : Présentation simplifiée des étapes du protocole de coloration *HER2*.

Étape	Réactif	Durée et température
Déparaffinage	Clearify™ (agent d'élimination)	10 minutes à 38 °C
Restauration des cibles	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minutes, à 97 °C
Lavage	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 x 3 minutes à 32 °C
Digestion*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minutes, 15 minutes ou 20 minutes
Séchage		15 minutes, à 45 °C
Dénaturation		10 minutes, à 66 °C
Hybridation	<i>HER2 IQFISH pharmDx™</i> (Dako Omnis)	75 minutes, à 45 °C
Lavage stringent	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minutes, à 61 °C

* Trois temps de digestion par la pepsine validés peuvent être choisis en utilisant les protocoles *HER2 IQFISH* mentionnés ci-dessus.

Si aucune autre coloration HIS n'est prévue dans l'immédiat, rétablir la température de conservation recommandée pour tous les réactifs.

B.4. Procédure de post-coloration

Décharger les lames et appliquer jusqu'à 30 µL de Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) contenant du DAPI sur la zone cible de la lame. La coupe de tissu doit être entièrement recouverte de Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Appliquer une lamelle de protection en verre.

REMARQUE : Les lames peuvent être analysées 15 minutes après le montage ou dans les 7 jours suivant le montage. Toutefois, une décoloration se produit si les lames sont exposées à la lumière ou à des températures élevées. Pour minimiser la décoloration, conserver les lames à l'abri de la lumière entre -18 et 8 °C.

Contrôle de qualité - Sein

1. Les signaux doivent être de couleur vive, bien distincts et faciles à évaluer.
2. Les cellules saines permettent un contrôle interne du cycle de coloration.
 - Les cellules normales doivent montrer un à deux signaux verts clairement visibles indiquant que la sonde PNA pour CEN-17 a réussi l'hybridation de la région centromérique du chromosome 17.
 - Les cellules normales doivent aussi montrer un à deux signaux rouges clairement visibles indiquant que la sonde ADN *HER2* a réussi l'hybridation des gènes *HER2*.
 - En raison du sectionnement des tissus, certaines cellules normales présenteront moins de deux signaux de chaque couleur.
 - L'absence de détection de signaux dans les cellules normales indique que le test a échoué et les résultats doivent être considérés comme non valides.
3. La morphologie nucléaire doit être intacte lors d'une évaluation à l'aide d'un filtre DAPI. La présence de nombreuses cellules fantômes et une mauvaise morphologie nucléaire générale indiquent une digestion trop forte de l'échantillon, ce qui peut avoir pour effet une perte ou une fragmentation des signaux. Ces échantillons doivent être considérés comme non valides.
4. Le nombre minimum de cellules tumorales pour l'évaluation est de 20.
5. Des différences dans la fixation, le traitement ou l'inclusion du tissu au niveau du laboratoire de l'utilisateur peuvent produire des variations significatives dans les résultats, ce qui exige une évaluation régulière des contrôles internes.

Interprétation de la coloration - Sein

Tissus pouvant être évalués

Seuls les échantillons des patients avec des carcinomes invasifs doivent être analysés. Dans les cas d'échantillons contenant à la fois des carcinomes *in situ* et invasifs, seuls les composants invasifs doivent être évalués. Éviter les zones de nécrose et celles où les limites nucléaires sont ambiguës. Ne pas inclure les noyaux nécessitant un jugement subjectif. Ne pas inclure les noyaux avec un signal de faible intensité et une coloration du bruit de fond non spécifique ou importante.

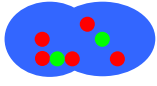



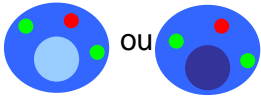




Numération des signaux

Localiser la tumeur dans le contexte de la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine et évaluer la même zone sur la lame colorée par la procédure FISH. Scanner plusieurs zones des cellules tumorales pour prendre en compte toute hétérogénéité possible. Sélectionner une zone présentant une bonne répartition des noyaux. Commencer l'analyse dans le quart supérieur gauche de la zone sélectionnée en scannant de gauche à droite et compter le nombre de signaux dans les limites nucléaires de chaque noyau évalué conformément aux directives ci-dessous (voir aussi l'Annexe 2).

- Régler la mise au point pour trouver tous les signaux dans chaque noyau.
- Compter deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comme un seul signal.
- Dans les noyaux avec une forte amplification du gène *HER2*, les signaux *HER2* peuvent être placés très proches les uns des autres et former un agrégat de signaux. Dans ce cas, il est impossible de compter le nombre de signaux *HER2* mais il doit être estimé. Faire particulièrement attention aux signaux verts car les agrégats de signaux *HER2* peuvent couvrir les signaux verts et les rendre impossible à voir. En cas de doute, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique.

Ne pas évaluer les noyaux sans signaux ou avec des signaux d'une seule couleur. Évaluer uniquement les noyaux avec un ou plusieurs signaux FISH de chaque couleur.

Guide de décompte des signaux

1		Ne pas compter. Les noyaux se chevauchent, toutes les zones des noyaux ne sont pas visibles.
2		Deux signaux verts, ne pas évaluer les noyaux avec des signaux d'une seule couleur.
3		Compter comme 3 signaux verts et 12 signaux rouges (estimation d'agrégat).
4		Compter comme 1 signal vert et 1 signal rouge. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
5		Ne pas compter (noyaux surdigérés ou sous-digérés). Signaux manquants dans le centre des noyaux (noyaux en forme d'anneau).
6		Compter comme 2 signaux verts et 3 signaux rouges. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
7		Compter comme 1 signal vert et 5 signaux rouges.
8		Compter comme 3 signaux verts (1 vert flou) et 3 signaux rouges.
9		Agrégat de signaux rouges cachant les signaux verts, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique ou ne pas compter.

Noter le décompte dans un tableau tel que celui donné dans l'Annexe 1.

Compter 20 noyaux par échantillon tissulaire dans une zone distincte des zones tumorales si possible (18).

Calculer le rapport *HER2*/CEN-17 en divisant le nombre total de signaux *HER2* rouges par le nombre total de signaux CEN-17 verts.

Les échantillons avec un rapport *HER2*/CEN-17 supérieur ou égal à 2 doivent être considérés comme présentant un gène *HER2* amplifié (3, 18-20).

Les résultats à la limite ou proche de la limite (1,8-2,2) doivent être interprétés avec prudence.

Si le rapport est proche de la limite (1,8-2,2), compter 20 noyaux de plus et recalculer le rapport pour les 40 noyaux.

En cas de doute, la lame d'échantillon doit être réévaluée. Pour les cas limites, une consultation entre le pathologiste et le médecin traitant est recommandée.

Limites - Sein

1. Pour une utilisation automatisée sur les instruments Dako Omnis uniquement.
2. Une formation spécialisée est nécessaire pour la sélection et la fixation des tissus, ainsi que pour la préparation des lames et l'interprétation de la coloration IGFISH. L'interprétation des colorations de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ne doit pas être assurée par des personnes présentant un trouble de la vision des couleurs.
3. Les résultats de l'analyse FISH dépendent de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Une fixation, un lavage, un séchage, un chauffage ou une coupe incorrects, ou bien une contamination par d'autres tissus ou fluides peuvent avoir une influence sur l'hybridation de la ou des sonde(s). Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ou à des irrégularités inhérentes au tissu.
4. Les performances du test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) n'ont pas été évaluées sur des échantillons de tumeurs mammaires avec microcalcifications.

Performances – Sein

Efficacité de l'hybridation

L'efficacité de l'hybridation du *HER2* IQFISH pharmDx™ a fait l'objet d'une étude sur 180 coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol testées sur trois sites de l'étude. Les 180 coupes de tissus peuvent être énumérées en fonction des consignes de décompte de produits. L'efficacité de l'hybridation était de 100%.

Les rapports *HER2/CEN-17* calculés et utilisés dans les études de performances sont basés sur un comptage des signaux dans 20 noyaux en utilisant les recommandations d'évaluation indiquées dans la section Interprétation de la coloration de ce mode d'emploi.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a fait l'objet d'une étude avec 20 échantillons de carcinomes du sein (10 échantillons au statut du gène *HER2* amplifié et 10 échantillons non amplifiés). Le rapport entre le nombre de signaux *HER2* et *CEN-17* a été calculé sur la base du décompte de 20 noyaux de cellules normales dans l'échantillon de tissus. Le rapport *HER2/CEN-17* pour les cellules normales identifiées dans les 20 échantillons de carcinomes du sein était entre 0,97 et 1,11.

Spécificité analytique

Les sondes ADN *HER2* dans *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ont été séquencées à la fin et mises sur une carte pour confirmer une couverture totale de 218 kb comprenant le gène *HER2*.

Les sondes PNA *CEN-17* dans le *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ont été testées individuellement et ensemble par FISH pour confirmer leur hybridation spécifique à la région centromérique du chromosome 17.

Pour exclure toute hybridation croisée des chromosomes autres que le chromosome 17, des études ont été menées sur les étalements de métaphases en suivant les procédures standard de CQ de Dako. Un total de 275 étalements de métaphases avec des signaux distincts a été évalué pour l'hybridation spécifique des mélanges de sonde ADN *HER2* et PNA CEN-17. Dans les 275 cas, l'hybridation était spécifique au chromosome 17. Aucune hybridation croisée sur les loci d'autres chromosomes n'a été observée dans les 275 cas. La spécificité des sondes était ainsi de 100% (275 sur 275).

Pour mesurer la capacité du test IQFISH à identifier uniquement les substances ciblées *HER2* et CEN-17 sans aucune interférence de la part d'autres substances, des études ont été menées sur des échantillons tissulaires de carcinomes du sein en omettant les sondes *HER2* et CEN-17 du mélange d'hybridation et uniquement en utilisant le tampon d'hybridation. En tout, 20 échantillons ont été évalués pour vérifier l'absence de signaux non associés au mélange de sondes. Aucune détection d'autres cibles de chromosomes ou aucune interférence avec des substances étroitement liées n'a été observée dans les 20 échantillons.

Études de robustesse

La robustesse du test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée en variant la concentration de la sonde PNA, la durée de restauration des cibles, la durée d'incubation de la pepsine, la durée de dénaturation, la durée d'hybridation, ainsi que la durée et la température du lavage stringent. Les paramètres ont été testés sur les cinq échantillons de tissus mammaires cancéreux inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE) (les échantillons tissulaires amplifiés et non amplifiés étaient représentés).

Tous les paramètres ont été testés en dessous et au-dessus des paramètres de protocole standard à l'exception de la concentration de la sonde PNA et de la température du lavage stringent, auxquelles le paramètre de protocole standard a été inclus dans le paramétrage.

Les paramètres de test sont les suivants :

Concentration de la sonde PNA : Testée à 100% et +/- 17%.

Durée de restauration des cibles : Testée à 13 min 45 s et 16 min 15 s.

Durée d'incubation de la pepsine : Testée à 14 min 45 s et 16 min 15 s.

Durée de dénaturation : Testée à 9 min 45 s et 10 min 45 s.

Durée d'hybridation : Testée à 70 min et 80 min.

Durée du lavage stringent : Testée à 8 min 45 s et 11 min 15 s.

Température du lavage stringent : Testée à 59 °C, 61 °C et 63 °C.

Les trois concentrations de la sonde PNA ont été évaluées dans un plan d'expérience fractionné (outil JMP, SAS), qui a été exécuté avec 12 protocoles de coloration, comme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 2. Douze protocoles de coloration sont utilisés dans l'étude de robustesse.

Numéro du protocole de robustesse	Paramètre de test						
	Durée de restauration des cibles (min)	Durée d'incubation de la pepsine (min)	Durée de dénaturation (min)	Durée d'hybridation (min)	Durée du lavage stringent (min)	Température du lavage stringent (°C)	Concentration PNA dans le mélange de sondes
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Les cinq échantillons tissulaires ont été colorés à l'aide des 12 protocoles.

L'étude de robustesse affichait l'intensité du signal et la qualité morphologique. Tous les protocoles ont produit une coloration dans tous les échantillons tissulaires (60 au total) avec des signaux de couleur vive, bien distincts et faciles à évaluer, ce qui permet de les décompter.

Qui plus est, l'effet de l'épaisseur tissulaire sur les résultats du test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testé en variant l'épaisseur de coupe des échantillons de tissus mammaires cancéreux inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE).

Cinq coupes consécutives de cinq échantillons humains de carcinome du sein de différentes épaisseurs (3, 4, 5, 6 et 7 µm) ont été testées avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). Le coefficient moyen de variation du rapport *HER2*/CEN-17 était de 5,8% (entre 4,3% et 7,1%).

Reproductibilité

La reproductibilité d'un jour à l'autre et de lot à lot en laboratoire a été testée à l'aide du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). Cette étude a été conçue comme une étude interne, en aveugle et randomisée des rapports *HER2*/CEN-17 sur des coupes provenant de huit échantillons de cancer du sein inclus en paraffine, fixés au formol avec divers niveaux de l'amplification du gène *HER2*. Les huit échantillons avaient été testés avec HercepTest™ et représentaient deux échantillons avec *HER2* IHC 0/1+, deux échantillons avec *HER2* IHC 2+, deux échantillons avec *HER2* IHC 3+ et deux échantillons avec le rapport pré-déterminé *HER2*/CEN-17 FISH entre 1,5 et 2,5 obtenu à l'aide du *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731). Chaque échantillon était coloré à l'aide de trois lots différents de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) sur cinq jours non consécutifs. 240 colorations tissulaires ont été traitées au total pour toute l'étude dans la mesure où chaque combinaison était colorée en double. La Figure 1 illustre les écarts entre les rapports en fonction des jours et des lots. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox par le biais d'un modèle d'effet aléatoire pour obtenir une homogénéité de variation entre les données. Le coefficient total de variation était estimé à 4,3%. La variation entre les jours et les lots y a contribué à hauteur de 1,5% et 0%, respectivement.

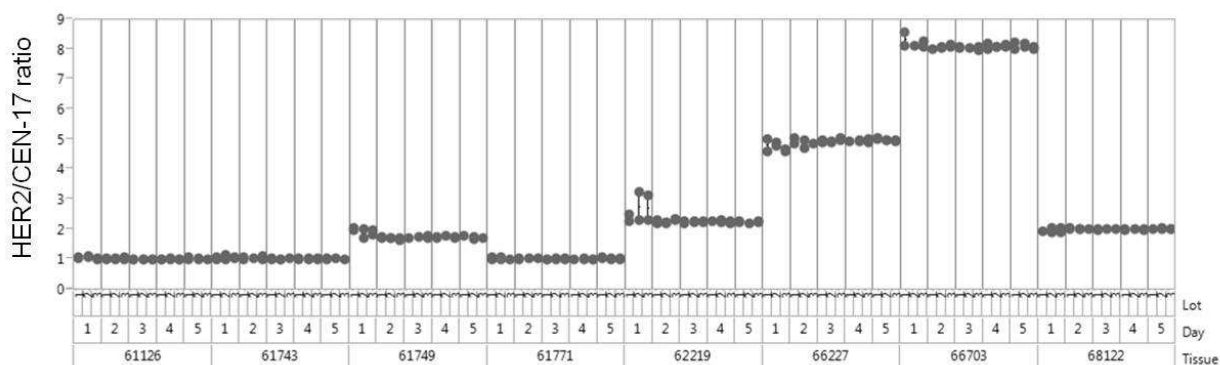


Figure 1. Rapports *HER2*/CEN-17 obtenus dans une étude de reproductibilité en laboratoire sur *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), y compris les résultats finaux de reproductibilité de lot à lot et d'un jour à l'autre.

Qui plus est, la reproductibilité inter-jours et intersites de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée en externe dans une étude sur trois sites (un site aux États-Unis et deux sites en Europe), stratifiée et en aveugle sur des coupes tissulaires provenant de 12 échantillons de cancer du sein inclus en paraffine et fixés au formol. Trois échantillons étaient *HER2* IHC 0/1+, trois échantillons étaient *HER2* IHC 2+, trois échantillons étaient *HER2* IHC 3+ et trois échantillons avaient le rapport pré-déterminé *HER2*/CEN-17 FISH entre 1,5 et 2,5 obtenu à l'aide du HercepTest™ et du *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731). Les échantillons étaient colorés et analysés sur les sites de l'étude. Chaque échantillon était coloré au moins cinq fois sur cinq jours non consécutifs et évalué par un observateur sur chaque site. 192 coupes étaient colorées et comprises dans l'analyse statistique. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox et les composants de variation ont été calculés. Le coefficient total de variation basé sur la limite supérieure de confiance à 95% était de 15%. La variation du rapport *HER2*/CEN-17 inter-jours et intersites est illustrée sur la Figure 2.

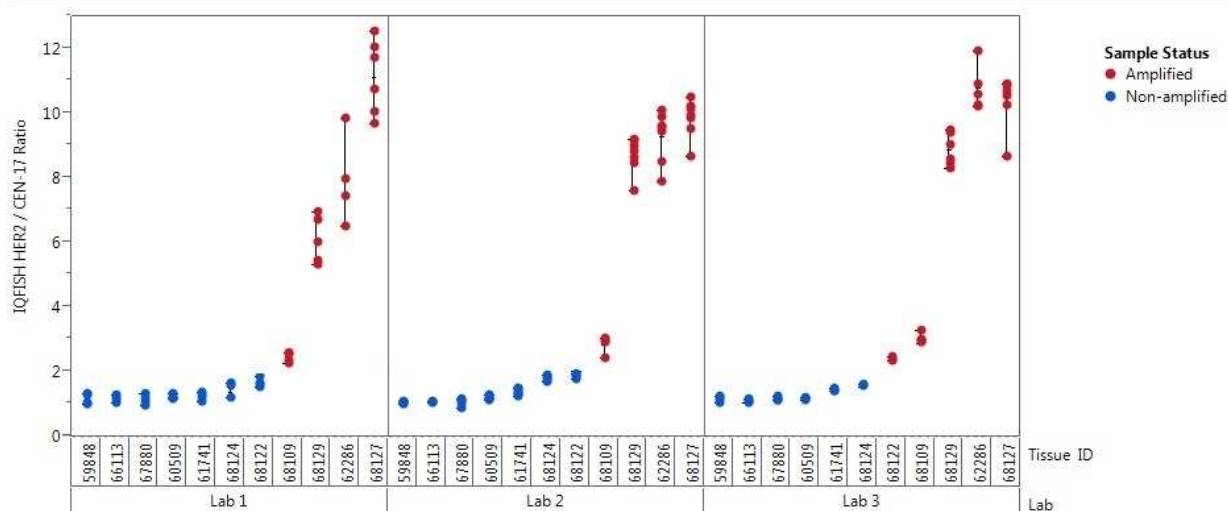


Figure 2. Tableau de variation des rapports *HER2*/CEN-17 dans les unités non transformées et obtenues dans l'étude de reproductibilité inter-jours et intersites du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) sur les échantillons de tissus mammaires cancéreux.

Le test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été mené pour la reproductibilité d'observateur à observateur dans le cadre d'une étude comparative interne avec trois observateurs pour évaluer indépendamment les échantillons colorés. La reproductibilité a été testée sur 140 échantillons humains de carcinome du sein au statut du gène *HER2* non amplifié ou amplifié. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox. Le coefficient moyen de variation pour la reproductibilité d'observateur à observateur était de 9%.

Répétabilité

La répétabilité en laboratoire du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée avec des coupes consécutives de huit échantillons humains de carcinome du sein au statut de gène *HER2* non amplifié ou amplifié. Les tissus ont été testés en double sur cinq jours non consécutifs avec trois lots différents dans 240 coupes au total (120 coupes en double). Le modèle d'effet aléatoire utilisé pour analyser les données s'est soldé par une variation attribuable aux jours et aux lots (comme indiqué dans l'étude de reproductibilité interne). La variation résiduelle correspond à la variation entre les reproductions et donc la répétabilité. La limite supérieure de confiance à 95% pour le coefficient de répétabilité de la variation était de 4,4%.

Études de comparaison

Comparaison des résultats *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et des résultats *HER2* IQFISH pharmDx™

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été comparé à *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731) dans une étude comparative sur 140 échantillons humains de carcinomes du sein. Les échantillons étaient constitués de 77 cas de non amplification du gène *HER2* et de 63 cas d'amplification du gène *HER2* avec une évaluation HercepTest™ connue, comme l'illustre le tableau 3.

Tableau 3. Répartition des échantillons en fonction des évaluations HercepTest™ et HER2 FISH (statut du gène HER2) obtenues avec HER2 IQFISH pharmDx™ (réf. K5731).

Évaluation de coloration HercepTest™	0	1+	2+	3+	Total
n	27	11	53	49	140
Statut du gène HER2 FISH					
Amplifié	2	0	13	48	63
Non amplifié	25	11	40	1	77
Total des échantillons testés par FISH	27	11	53	49	140

Le tableau 4 présente les résultats de tabulation croisée du statut du gène HER2 obtenus à la suite de deux tests calculant le pourcentage de concordance globale, le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative. La Figure 3 présente la corrélation entre les rapports HER2/CEN-17 à l'aide de ces deux tests.

Tableau 4. Tabulation croisée du statut de gène HER2 obtenue à l'aide de HER2 IQFISH pharmDx™ (réf. K5731) et HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		Statut de gène HER2 (K5731)		Total
		Non amplifié	Amplifié	
Statut de gène HER2 (Dako Omnis)	Non amplifié	77	0	77
	Amplifié	0	63	63
Total		77	63	140
Pourcentage de concordance globale : 100% Pourcentage de concordance positive : 100% Pourcentage de concordance négative : 100%				

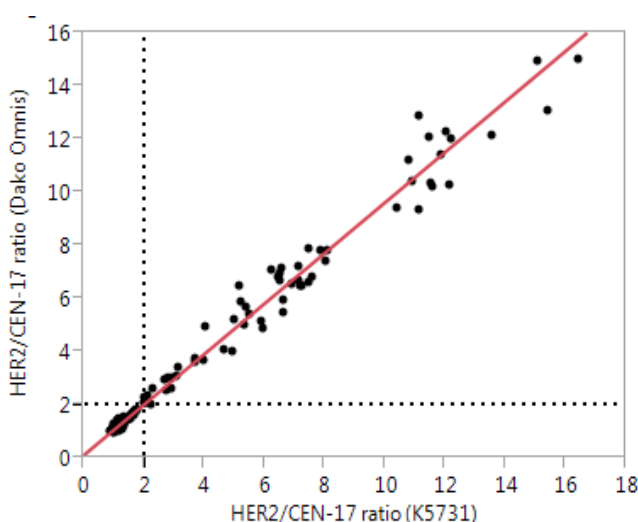


Figure 3. Corrélation entre les rapports HER2/CEN-17 à l'aide de HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et HER2 IQFISH pharmDx™ (réf. K5731) sur 140 échantillons de cancer du sein (introduction linéaire : $y = 0,11 + 0,95 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. Pondération avec une variation inverse pour autoriser une introduction linéaire).

Les rapports HER2/CEN-17 ont fait l'objet d'une transformation logarithmique à des fins d'analyse. L'intervalle de confiance à 95% pour l'écart moyen entre les deux méthodes de coloration sur le rapport HER2/CEN-17 = 2 était de [0,002 ; 0,031]. En d'autres termes, un écart supérieur à 3% n'est pas prévu avec un intervalle de confiance à 95%.

L'erreur quadratique moyenne (EQM) était de 9%, ce qui indique l'importance de fluctuation moyenne autour de la valeur moyenne.

Comparaison des résultats de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) aux résultats du kit PathVysion *HER-2* DNA Probe

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été comparé au kit PathVysion *HER-2* DNA Probe dans une étude comparative sur 140 échantillons humains de carcinomes du sein. Les échantillons étaient constitués de 80 cas de non amplification du gène *HER2* et de 60 cas d'amplification du gène *HER2* avec une évaluation HercepTest™ connue, comme l'illustre le tableau 5.

Tableau 5. Répartition des échantillons en fonction des évaluations HercepTest™ et *HER2* FISH (statut du gène *HER2*) obtenues avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731).

Évaluation de coloration HercepTest™	0	1+	2+	3+	Total
n	28	10	54	48	140
Statut du gène <i>HER2</i> FISH					
Amplifié	1	0	12	47	60
Non amplifié	27	10	42	1	80
Total des échantillons testés par FISH	28	10	54	48	140

Le tableau 6 présente les résultats de tabulation croisée du statut du gène *HER2* obtenus à la suite de deux tests calculant le pourcentage de concordance globale, le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative. La Figure 4 présente la corrélation entre les rapports *HER2*/CEN-17 à l'aide de ces deux tests.

Tableau 6. Tabulation croisée du statut de gène *HER2* obtenue à l'aide du kit PathVysion *HER-2* DNA Probe et *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		Statut de gène <i>HER2</i> (PathVysion)		Total
		Non amplifié	Amplifié	
Statut de gène <i>HER2</i> (Dako Omnis)	Non amplifié	80	0	80
	Amplifié	0	60	60
Total		80	60	140
Pourcentage de concordance globale : 100% Pourcentage de concordance positive : 100% Pourcentage de concordance négative : 100%				

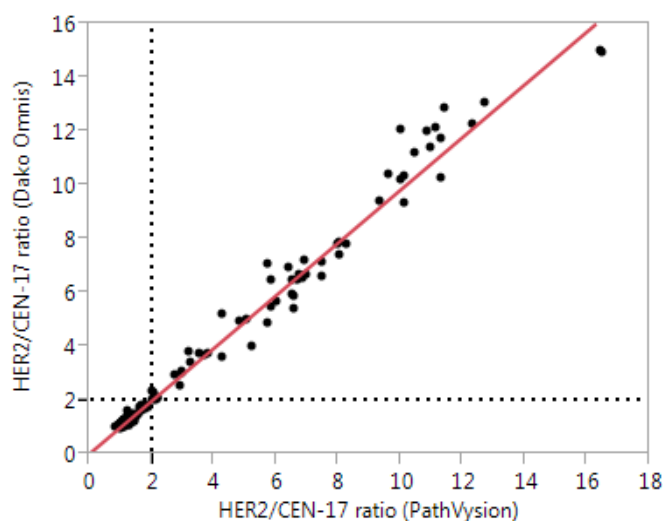


Figure 4. Corrélation entre les rapports *HER2*/CEN-17 à l'aide de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et PathVysion sur 140 échantillons de cancer du sein (introduction linéaire : $y = 0,01 + 0,98 \cdot x$; $R^2 = 0,96$. Pondération avec une variation inverse pour autoriser une introduction linéaire).

Les rapports *HER2*/CEN-17 ont fait l'objet d'une transformation logarithmique à des fins d'analyse. L'intervalle de confiance à 95% pour l'écart moyen entre les deux méthodes de coloration sur le rapport *HER2*/CEN-17 = 2 était de [0,001 ; 0,031]. En d'autres termes, un écart supérieur à 3% n'est pas prévu avec un intervalle de confiance à 95%.

L'erreur quadratique moyenne (EQM) était de 10%, ce qui indique l'importance de fluctuation moyenne autour de la valeur moyenne.

Utilité clinique dans la sélection des patients à traiter au Herceptin™ (trastuzumab)

Le kit *HER2* FISH pharmDx™ a fait l'objet d'études comparatives avec le kit PathVysion *HER-2* DNA Probe et le test HercepTest™ de Dako. Les résultats des tests du *HER2* FISH sont disponibles pour 940 échantillons de cancer du sein.

Comparaison des résultats du kit *HER2* FISH pharmDx™ aux résultats du kit PathVysion *HER-2* DNA Probe

Trois études ont été menées pour comparer les résultats du test de kit *HER2* FISH pharmDx™ aux résultats du test de kit PathVysion *HER-2* DNA Probe (voir le tableau 7). Ces études se sont déroulées sur plusieurs sites géographiques, les échantillons ont été utilisés sans chevauchement. 328 échantillons ont fait l'objet de tests.

Tableau 7. Données récapitulatives des études comparatives par FISH.

Nom de l'étude	Étude de concordance (échantillons danois, N = 190)	Étude de concordance (échantillons japonais, N = 52)	Étude de concordance (échantillons français, N = 86) (21)*
Concordance (intervalle de confiance à 95%)	93,68% (90,22% à 97,14%)	96,15%	
Pourcentage de concordance positive (intervalle de confiance à 95%)	86% (77,34% à 95,08%)	97%	
Pourcentage de concordance négative (intervalle de confiance à 95%)	97% (94,05% à 99,89%)	96%	

* Des données comparatives ont été fournies dans cet article mais le test HER2 FISH n'a pas été identifié.

On comptait 12 résultats de test divergents entre le test du kit *HER2* FISH pharmDx™ et le test du kit PathVysion™ HER-2 DNA Probe pour les échantillons cliniques danois (voir le tableau 8).

Tableau 8. Données récapitulatives pour les 12 résultats de test divergents.

<i>HER2</i> FISH (positive)/PathVysion (négative)				<i>HER2</i> FISH (négative)/PathVysion (positive)			
ID#	Rapport <i>HER2</i> FISH	Rapport PathVysion	Évaluation HercepTest	ID#	Rapport <i>HER2</i> FISH	Rapport PathVysion	Évaluation HercepTest
160	2,10* (1,82 à 2,51)	1,51 (1,39 à 1,68)	2+	234	1,68 (1,38 à 1,83)	2,02* (1,84 à 2,29)	2+
208	3,61 (2,95 à 4,73)	1,62 (1,51 à 1,82)	2+	284	1,44 (1,07 à 1,83)	2,21* (1,94 à 2,64)	2+
306	2,20* (1,79 à 2,24)	1,33 (1,18 à 1,44)	1+	423	1,7 (1,52 à 1,95)	2,15 (2,02 à 2,45)	1+
846	2,58 (2,06 à 3,50)	1,51 (1,42 à 1,76)	2+	474	1,44 (1,16 à 1,83)	2,55 (2,38 à 3,26)	2+
				735	1,68 (1,40 à 1,99)	2,03* (1,89 à 2,19)	2+
				746	1,05 (0,96 à 1,18)	4,53 (4,27 à 5,17)	3+
				837	1,52 (1,48 à 1,79)	2,15 (2,10 à 2,67)	3+
				881	1,83* (1,15 à 2,69)	2,68 (2,39 à 3,14)	2+

* IC des rapports moyens consignés incluant 2,0. Les chiffres entre parenthèses sont l'IC à 95%

Dans cette analyse de divergence, les rapports consignés ont été utilisés. L'intervalle de confiance à 95% a été calculé pour les 60 rapports consignés provenant des noyaux utilisés pour calculer le rapport du kit PathVysion HER-2 DNA Probe. Aucun intervalle IC n'incluait la valeur critique de 2 pour les 4 cas où le kit *HER2* FISH pharmDx™ était positif et le kit PathVysion HER-2 DNA Probe était négatif. L'IC à 95% de 3 (#234, 284 et 735) incluait la valeur critique de 2 pour les 8 cas où le kit *HER2* FISH pharmDx™ Kit était négatif et le kit PathVysion HER-2 DNA Probe était positif. De même, l'intervalle de confiance à 95% était calculé pour les rapports consignés provenant des noyaux utilisés pour calculer le rapport du kit *HER2* FISH pharm Dx™. L'IC de 2 (#160 et 306) incluait la

valeur critique de 2 pour les 4 cas où le kit *HER2* FISH pharmDx™ était positif et le kit PathVysion HER-2 DNA Probe était négatif. L'IC à 95% de 1 (#881) incluait la valeur critique de 2 pour les 8 cas où le kit *HER2* FISH pharmDx™ était négatif et le kit PathVysion HER-2 DNA Probe était positif.

Comparaison des résultats du kit *HER2* FISH pharmDx™ aux résultats du test HercepTest™
Quatre études ont été menées pour comparer le kit *HER2* FISH pharmDx™ aux résultats du test HercepTest™. 940 échantillons ont été comparés en utilisant l'évaluation de la coloration 3+ comme résultat d'IHC positif dans le test HercepTest™ (voir le tableau 9).

Tableau 9. Récapitulatif des études comparatives du kit *HER2* FISH pharmDx™ et de l'IHC (HercepTest™).

Nom de l'étude	Échantillons cliniques danois (N = 682)	Échantillons japonais (N = 52)	Étude française (N = 86) (31)	Étude pilote danoise (N = 120) (22)
Concordance (Intervalle de confiance à 95%)	93,11% (91,21% à 95,01%)	96,15%	87,21%	93,33%
Pourcentage de concordance positive (Intervalle de confiance à 95%)	91% (87,39% à 94,57%)	96%	87%	84%
Pourcentage de concordance négative (Intervalle de confiance à 95%)	94% (92,12% à 96,46%)	96%	87%	97%

Le tableau 10 présente la répartition des données de tests HercepTest™ et *HER2* FISH pour les échantillons cliniques danois.

Tableau 10. Répartition du statut de gène *HER2* par test HercepTest™ et par kit *HER2* FISH pharmDx™.

Évaluation de coloration HercepTest™	0	1+	2+	3+	Total
n	221	267	84	248	820
%	27	33	10	30	100%
Statut du gène <i>HER2</i> FISH					
Amplifié	0	8	17	222	247
Non amplifié	106	245	62	22	435
Total des échantillons testés par FISH	106	253	79	244	682

Dépannage - Sein

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
1. Pas de signal ou signaux faibles	<p>1a. Les réactifs ont été exposés à des températures élevées pendant le transport ou la conservation</p> <p>1b. Le microscope ne fonctionne pas correctement</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mauvais jeu de filtres - Mauvaise lampe - Lampe à mercure trop vieille - Lentilles du collecteur sales et/ou fissurées - Mauvaise huile d'immersion <p>1c. Signaux décolorés</p> <p>1d. Tampons mal identifiés</p>	<p>1a. Vérifier les conditions de conservation. S'assurer qu'il restait de la neige carbonique à la réception des colis contenant le mélange de sondes IQISH et la pepsine. S'assurer que les réactifs ont été conservés comme indiqué.</p> <p>1b. Vérifier le microscope et s'assurer que les filtres utilisés conviennent pour les fluorochromes du mélange de sondes et que la lampe au mercure est la bonne et qu'elle n'a pas été utilisée au-delà de sa durée de vie prévue (voir l'annexe 2). En cas de doute, contacter le distributeur local du microscope.</p> <p>1c. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition aux sources de lumière vive.</p> <p>1d. Remettre en place les tampons en gros volume et s'assurer qu'ils sont correctement enregistrés (sur la station de travail) et identifiés (sur l'écran tactile). Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus d'informations. Il convient de noter que la solution ISH Pre-Treatment Solution est verte et la solution ISH Stringent Wash Buffer est jaune.</p>
2. Zones sans signal	2. Bulles d'air prises durant le montage	2. Éviter la formation de bulles d'air. Si des bulles sont observées, les éliminer en tapotant doucement à l'aide de pinces.

Cancer du sein

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
3. Coloration de fond excessive	3a. Mauvaise fixation du tissu	3a S'assurer que seules des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol sont utilisées.
	3b. Exposition prolongée de la coupe hybridée à une lumière vive	3b. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition à la lumière vive.
4. Mauvaise morphologie tissulaire	4a. Mauvais traitement à la pepsine	4a. Utiliser l'un des trois autres protocoles de coloration. S'assurer que la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) est conservée à une température adéquate.
	4b. Un traitement trop long à la pepsine ou des coupes très fines peuvent faire apparaître des cellules fantômes ou en forme d'anneau.	4b. Essayer un protocole de coloration avec un temps d'incubation dans la pepsine plus court. S'assurer que l'épaisseur de coupe est comprise entre 4 et 6 µm.
5. Autofluorescence verte importante sur la lame, y compris dans les zones dépourvues de tissu FFPE	5. Utilisation de lames en verre périmées ou non recommandées	5. Choisir des lames de verre comme spécifié. S'assurer que les lames en verre ne sont pas périmées.

REMARQUE : Si le problème ne peut être attribué à l'une des causes mentionnées ci-dessus, ou si l'action corrective échoue, contacter le service technique Dako pour obtenir de l'aide.

Annexe 1 - Sein

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), réf. GM333

Feuille d'évaluation

Date du cycle : _____ ID du registre du cycle de coloration : _____

Lot HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) : _____ ID de l'échantillon : _____

Comptage des signaux dans 20 noyaux					
Noyau N°:	Note HER2 (rouge)	Note CEN-17 (vert)	N° noyau	Note HER2 (rouge)	Note CEN-17 (vert)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total (1-10)			Total (11-20)		

Pour la détermination du rapport *HER2/CEN-17*, compter le nombre de signaux *HER2* et celui des signaux *CEN-17* sur les 20 mêmes noyaux, et diviser le nombre total de signaux *HER2* par le total de signaux *CEN-17*. Si le rapport *HER2/CEN-17* se trouve à la limite (1,8-2,2), compter 20 noyaux de plus et recalculer le rapport pour les 40 noyaux.

Un rapport à la valeur-seuil ou proche de la valeur-seuil (1,8-2,2) doit être interprété avec prudence (voir le guide de comptage).

	HER2	CEN-17	Rapport HER2/CEN-17
Score total (1 à 20)			

Comptage des signaux dans 20 noyaux supplémentaires					
N° noyau	Note <i>HER2</i> (rouge)	Note CEN-17 (vert)	N° noyau	Note <i>HER2</i> (rouge)	Note CEN-17 (vert)
21			31		
22			32		
23			33		
24			34		
25			35		
26			36		
27			37		
28			38		
29			39		
30			40		
Total (21-30)			Total (31-40)		

Calculer le rapport *HER2*/CEN-17 issu des 40 noyaux comptés

	<i>HER2</i>	CEN-17	Rapport <i>HER2</i> /CEN-17
Score total (1 à 40)			

- Rapport < 2 : Aucune amplification du gène *HER2* observée
- Rapport ≥ 2 : Amplification du gène *HER2* observée

Date et signature du technicien : _____

Date et signature du pathologiste : _____

Pour les directives d'évaluation, voir la section Interprétation de la coloration.

Annexe 2 - Sein

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), réf. GM333

Spécifications du microscope à fluorescence

Dako recommande l'équipement suivant pour une utilisation avec HER2 IQFISH pharmDx™, (Dako Omnis), GM333 :

1. Type de microscope

- Microscope à épifluorescence

2. Lampe

- Lampe à mercure de 100 watts (noter la durée d'utilisation)

3. Objectifs

- Pour la sélection des tissus, des objectifs à immersion à l'huile 16x ou 20x conviennent
- Pour un fort grossissement et la numération des signaux, seuls des objectifs à immersion à l'huile, p. ex. 100x, sont recommandés.

4. Filtres

Les filtres sont conçus individuellement pour des fluorochromes spécifiques et doivent être choisis en conséquence. Dako recommande l'utilisation d'un filtre DAPI spécifique combiné à un double filtre Texas Red/FITC de haute qualité.

- Filtre DAPI, p. ex. filtre Chroma réf. 31000
- Filtre double Texas Red/FITC, p. ex. filtre de Omega Optical réf. XF53 ou filtre de Chroma réf. 51006
- Les filtres Texas Red et FITC simples peuvent être utilisés pour la confirmation et la numération.

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Les filtres sont spécifiques à chaque type de microscope et l'utilisation des filtres appropriés est cruciale pour l'interprétation. Pour obtenir des informations détaillées, contacter le fournisseur du microscope ou votre représentant Dako.

5. Huile

- Huile non fluorescente

Précautions d'emploi

- L'emploi d'une lampe au mercure de 50 watts n'est pas recommandé
- Les filtres rhodamine ne peuvent pas être utilisés
- Les filtres triples ne sont pas recommandés

Un microscope non optimisé peut causer des problèmes pour la lecture des signaux fluorescents. Il est important que la source de lumière n'ait pas dépassé la date de péremption et qu'elle soit correctement alignée et centrée.

Les clients doivent contrôler et suivre les recommandations du fabricant concernant la lampe à mercure. Le microscope doit être maintenu et la lampe à mercure doit être dans l'alignement avant l'interprétation des résultats.

Tous les efforts doivent être faits pour exposer l'échantillon le moins possible à la lumière d'excitation pour minimiser la décoloration de la fluorescence.

Nous recommandons que vous discutiez du paramétrage de votre microscope particulier avant de commencer l'hybridation *in situ* fluorescente ou que vous vous reportiez à la documentation.

Résumé et explication – Estomac

Le gène humain *HER2* (également connu sous le nom de *ERBB2* ou *NEU*) se trouve sur le chromosome 17 et code la protéine HER2 ou p185^{HER2}. La protéine HER2 est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase possédant une homologie avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR ou HER1) (1-2). Le gène *HER2* est présent en deux copies dans toutes les cellules diploïdes normales.

La surexpression de la protéine HER2 et l'amplification du gène *HER2* dans le cancer de l'estomac ont été démontrées dans un grand nombre d'études (répertoriées à la référence (23)). La positivité à la HER2 peut être détectée chez environ 20% des patients par ICH ou FISH (23). Les études précliniques in vitro et in vivo ont démontré l'efficacité du trastuzumab (Herceptin™) dans divers types de cancers de l'estomac, conduisant ainsi à la réalisation de plusieurs études cliniques (23-27).

Tous les patients participant à l'étude de phase III BO18255 (ToGA "Une étude multicentrique, randomisée, en ouvert, de phase III visant à évaluer le trastuzumab en association avec un traitement à base de fluoropyrimidine et cisplatine contre une chimiothérapie seule en traitement de première intention chez les patients atteints d'un cancer de l'estomac HER2-positif à un stade avancé") commanditée par Hoffmann-La Roche AG ont été sélectionnés à l'aide du HercepTest™ (IHC) et du kit *HER2* FISH pharmDx™ (FISH) de Dako avec positivité à l'HER2 définie comme IHC 3+ ou FISH+ (*HER2*/CEN-17 $\geq 2,0$). L'étude a mis en évidence l'utilité clinique du HercepTest™ (IHC) et du kit *HER2* FISH pharmDx™ (FISH) dans le cadre de l'évaluation du statut du gène HER2 chez les patients atteints d'un adénocarcinome avancé de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne pour lesquels un traitement par trastuzumab est envisagé (28).

Aucun patient dont les tumeurs n'étaient pas associées à une amplification du gène mais à une surexpression faible à forte de la protéine HER2 n'a été recruté [FISH(-)/IHC 2+]. Il est donc difficile de savoir si le traitement par Herceptin™ apportera un bénéfice aux patients dont les tumeurs n'étaient pas associées à une amplification du gène mais à une surexpression de la protéine HER2 [FISH(-), IHC 2+ or 3+]. Cette étude a également démontré que l'amplification des gènes (FISH) et la surexpression des protéines (IHC) ne sont pas autant corrélées que dans le cancer du sein ; ainsi le statut de HER2 ne doit pas être déterminé par une seule méthode.

Ce produit (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)) est un mélange de sondes IQISH pour l'amplification du gène *HER2* en vue d'une détection automatisée par la méthode FISH directe. Ce produit doit être utilisé avec les réactifs accessoires indiqués sur le système Dako Omnis et il est dérivé du test d'amplification du gène *HER2* réalisé manuellement, *HER2* IQFISH pharmDx™, réf. K5731.

Principe de la procédure – Estomac

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une sonde IQISH constituée d'un mélange de sondes ADN marquées au Texas Red couvrant une région de 218 kb incluant le gène *HER2* sur le chromosome 17 et d'un mélange de sondes PNA (13) (acide nucléique peptidique) marquées à la fluorescéine ciblant la région centrométrique du chromosome 17 (CEN-17). L'hybridation spécifique des deux cibles entraîne la formation d'un signal rouge fluorescent distinct sur chaque locus du gène *HER2* et d'un signal vert fluorescent distinct sur chaque centromère du chromosome 17.

L'analyse de l'amplification du gène *HER2* avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une méthode entièrement automatisée sur l'instrument Dako Omnis. Trois différents protocoles de coloration FISH validés pour *HER2* peuvent être sélectionnés dans le logiciel de la station de travail Dako Link Omnis. Les protocoles diffèrent uniquement par le temps de digestion par la pepsine. Par conséquent une digestion par la pepsine pendant 10 min (protocole court), 15 min (protocole moyen) ou 20 min (protocole long) peut être choisie (voir ci-dessous). Le protocole moyen est recommandé pour l'analyse initiale.

Après coloration sur l'appareil Dako Omnis, les échantillons sont montés avec du Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et recouverts d'une lamelle de protection. À l'aide d'un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés (voir Annexe 5), les cellules tumorales sont localisées et une numération des signaux rouges (*HER2*) et verts (CEN-17) est effectuée. Puis, le rapport *HER2*/CEN-17 est calculé. Les cellules normales dans la coupe de tissu analysée servent de contrôle positif interne de l'efficacité du prétraitement et de l'hybridation.

Pour plus d'informations, voir la section Interprétation de la coloration.

Consulter les Guide(s) d'utilisation Dako Omnis pour obtenir des instructions détaillées sur le chargement et le déchargement des lames, les couvercles HIS (Dako Omnis), réf. GC102, les réactifs, les liquides de rinçage en gros volume et les déchets.

Réactifs – Estomac

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et les réactifs accessoires peuvent être commandés séparément.

Matériel fourni

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) : 1,6 mL, prêt à l'emploi, mélange de sondes ADN pour *HER2* marquées au Texas Red et de sondes PNA pour CEN-17 marquées à la fluorescéine, fourni dans le tampon d'hybridation IQISH. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est expédié sur de la neige carbonique. **Afin de s'assurer que le réactif n'a pas été exposé à des températures élevées pendant le transport, il doit rester de la neige carbonique dans l'emballage à la réception.** Les flacons de réactifs dont le contenu est décongelé doivent toujours être conservés et manipulés verticalement.

Le flacon de réactif contient une bille en métal plaqué or qui sert au mélange du réactif à l'aide du dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device (voir le Guide d'utilisation du dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device). Il est important que le réactif soit soigneusement mélangé avant le chargement sur le Dako Omnis.

Matériel requis mais non fourni

Réactifs accessoires

Les réactifs suivants doivent être chargés sur l'instrument Dako Omnis pour pouvoir réaliser une analyse de l'amplification du gène *HER2* avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) :

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) : 175 mL, concentrée 20x ; à diluer dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume 3,5 L Dako Omnis (réf. GC109). Ce produit contient un agent antimicrobien et une teinte verte inerte pour en faciliter l'identification et l'utilisation.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) : 14 mL, éthanol à 96% (prêt à l'emploi).

ISH Pepsin (Dako Omnis) : 7 mL, solution de pepsine A (prête à l'emploi), pH 2,0 ; contient un agent stabilisateur et un agent antimicrobien. La solution Pepsin est expédiée sur de la neige carbonique. **Afin de s'assurer que le réactif n'a pas été exposé à des températures élevées pendant le transport, il doit rester de la neige carbonique dans l'emballage à la réception.**

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) : 175 mL d'une solution saline de citrate de sodium concentrée 20x ; à diluer dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume 3,5 L Dako Omnis (réf. GC109). Ce produit contient un agent antimicrobien, un détergent et une teinte jaune inerte pour en faciliter l'identification et l'utilisation.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) : 0,8 mL, Fluorescence Mounting Medium (prêt à l'emploi) contenant du DAPI.

Bien que les réactifs ci-dessus ne soient pas fournis avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), ils sont brièvement décrits ci-dessous. Consulter les instructions d'utilisation de chaque dispositif pour de plus amples informations.

Réactifs et dispositifs supplémentaires

Dako Omnis, réf. G1100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), réf. GC807

Clearify™, réf. GC810

Dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device, réf. GC116

ISH Lid, réf. GC102

ISH Cleaning Solution, réf. GC207

Lamelles de protection pour le montage (24 mm x 50 mm)

Consulter le Guide d'utilisation de base et le Guide d'utilisation avancée pour l'utilisation de réactifs et dispositifs supplémentaires.

Microscope et accessoires

Filtres pour microscope à fluorescence : Double filtre DAPI et FITC/Texas Red ou filtres simples FITC et Texas Red - voir l'Annexe 5 pour plus d'informations. L'utilisation d'un filtre DAPI à fort grossissement affecte négativement l'intensité du signal. Les temps d'exposition longs doivent être évités.

Il est recommandé d'utiliser un microscope à fluorescence équipé d'une lampe à mercure de 100 watts comme source de lumière. L'utilisation d'autres sources de lumière n'est pas recommandée pour ces filtres.

Boîte de rangement des lames de microscope (plateau en carton pour 20 lames avec couvercle à charnière ou similaire).

Précautions d'emploi – Estomac

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) contient ≥ 10 à $< 25\%$ de carbonate d'éthylène et ≥ 3 à < 5 de chlorure de sodium. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) comporte l'étiquette suivante :



Attention

H319

Provoque une sévère irritation des yeux.

P280

Porter un équipement de protection des yeux ou du visage.

P264

Se laver les mains soigneusement après manipulation.

P305 + P351 + P338

EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit.

Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.

4. Les échantillons tissulaires, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux qui y ont été exposés, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection, et doivent être éliminés avec toutes les précautions d'emploi nécessaires (14). Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.

5. Minimiser tout risque de contamination microbienne des réactifs afin d'éviter des résultats erronés.
6. Toute modification des méthodes de fixation des tissus et des épaisseurs d'échantillons spécifiées peut affecter la morphologie tissulaire et/ou l'intensité du signal.
7. Le réactif a été dilué de façon optimale. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte des performances.
8. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. Se reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) pour plus d'informations.
9. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
10. En raison de la nature hétérogène des échantillons de cancers de l'estomac, il est important de procéder à l'examen approfondi de la totalité de l'échantillon afin d'évaluer la distribution des signaux avant de sélectionner une zone particulière pour le décompte des signaux.
11. Il n'est pas recommandé d'évaluer des échantillons de très petite taille (en d'autres termes, les échantillons doivent posséder une morphologie intacte et suffisamment de noyaux pour permettre le décompte).
12. Si l'analyse FISH de *HER2* est réalisée sur un échantillon issu d'une biopsie, il faut, pour assurer une détermination fiable du statut de *HER2*, analyser plusieurs biopsies analysables (sept à huit) provenant de différentes régions de la tumeur.
13. Pour l'identification de tous les tissus d'un échantillon de biopsie, il est important d'inspecter la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine.
14. L'amplification du gène *HER2* et la surexpression de la protéine *HER2* ne sont pas autant corrélées dans le cancer de l'estomac que dans le cancer du sein. Ainsi le statut de *HER2* ne doit pas être déterminé par une seule méthode.

Conservation – Estomac

Conserver *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) à une température <-18 °C (une température comprise entre -18 °C et -25 °C est recommandée) à l'abri de la lumière. Toujours conserver le flacon de réactif décongelé en position verticale. Le réactif peut être congelé et décongelé à 10 reprises sans affecter les performances. Ne pas laisser ce composant à température ambiante.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et les réactifs accessoires ISH Pepsin (Dako Omnis) et Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) peuvent être affectés s'ils sont exposés à la chaleur. Ne pas laisser ces composants à température ambiante.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et les réactifs accessoires Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) peuvent être affectés en cas d'exposition à une luminosité excessive. Ne pas conserver ces éléments, ni procéder à l'analyse sous une lumière trop vive telle que la lumière directe du soleil.

Conserver les réactifs accessoires ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) et Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Conserver la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) à une température comprise entre -18 et 8 °C. Le bouchon du flacon, y compris le bouchon à charnière, doit être fermé pour tous les réactifs pendant la conservation.

Les solutions diluées (solutions de travail ISH Stringent Wash Buffer et ISH Pre-Treatment Solution) peuvent être conservées entre 2 et 8 °C pendant 30 jours.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur le récipient du réactif. Lors du stockage, le bouchon, y compris le bouchon à charnière, doit être fermé. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, la performance des réactifs doit être validée par l'utilisateur (15).

Aucun signe évident n'indique l'instabilité de ce produit. Par conséquent, il est important d'évaluer les cellules normales dans la coupe de tissu analysée. Si un profil de fluorescence inattendu et inexplicable est observé et en cas de suspicion d'un problème avec *HER2* IQFISH pharmDx™, contacter le service technique Dako.

Stabilité sur l'instrument Dako Omnis

La stabilité des produits *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) et des réactifs accessoires (ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) et ISH Pepsin (Dako Omnis)) sur l'instrument est de 80 jours. La stabilité des produits ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) et ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) est de sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. En cas d'utilisation de réactifs périmés, l'instrument Dako Omnis affiche un message d'avertissement. Toutes les lames colorées avec le réactif périmé sont signalées comme douteuses et le journal des lames affiché sur la station de travail indique qu'un réactif périmé a été utilisé.

Préparation des échantillons – Estomac

Les échantillons d'adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne provenant des biopsies, excisions ou résections doivent être manipulés de manière à préserver le tissu pour l'analyse FISH. Les méthodes standard de traitement des tissus pour un immunomarquage doivent être utilisées pour tous les échantillons (16). Lors du test de petits échantillons de biopsie, s'assurer que la morphologie tumorale est intacte et que les noyaux sont présents en quantité suffisante pour la numération. Si l'analyse FISH de *HER2* est réalisée sur un échantillon issu d'une biopsie, il faut, pour assurer une détermination fiable du statut de *HER2*, analyser plusieurs biopsies analysables (sept à huit) provenant de différentes régions de la tumeur.

Coupes incluses en paraffine

Seuls les tissus préservés dans du formol tamponné neutre et inclus en paraffine conviennent à cet usage. Les échantillons doivent, par exemple, être inclus dans des blocs d'une épaisseur de 3 à 4 mm et être fixés pendant 18 à 24 heures dans du formol neutre tamponné. Les échantillons de biopsies ont été fixés pendant six à huit heures dans l'étude ToGA (pour plus d'informations relatives à l'étude, se reporter à la référence (28)). Les tissus sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol et de xylène à des concentrations croissantes, puis infiltrés avec de la paraffine liquide maintenue à une température ne dépassant pas 60 °C. Les tissus correctement inclus et fixés se conservent indéfiniment avant leur coupe et le montage sur lame s'ils sont conservés dans un endroit frais (entre 15 et 25 °C) (16-17). Les autres fixateurs ne conviennent pas.

Les échantillons tissulaires doivent être découpés en sections de 3 à 6 µm.

Les lames nécessaires pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2* et la vérification de la présence d'une tumeur doivent être préparées au même moment. Un minimum de deux coupes consécutives est recommandé, une coupe pour détecter la présence d'une tumeur colorée à l'hématoxyline et l'éosine (coloration H&E), et une coupe pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2*. Il est recommandé de monter les coupes de tissus sur des lames Dako FLEX IHC Microscope Slides, réf. K8020. Les lames Superfrost Plus Slides (Thermo Fischer Scientific, J1800AMNZ) conviennent également. S'assurer que les lames en verre ne sont pas périmées. Les échantillons doivent être analysés dans les six mois après la coupe lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 25 °C.

REMARQUE : Les échantillons tissulaires doivent être placés sur le verre à l'intérieur de la zone de coloration définie pour les lames. Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour connaître les dimensions de la zone de coloration des lames.

INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Estomac

A. Préparation des réactifs – Estomac

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

Le flacon de la sonde *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) contient une bille en métal plaqué or qui sert au mélange. Avant de charger le flacon sur l'instrument Dako Omnis, le réactif doit être décongelé et soigneusement mélangé car ses phases se séparent lors de la congélation.

Utiliser le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device pour mélanger la sonde.

Suivre la procédure ci-dessous pour mélanger la sonde sur le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device et consulter le Guide d'utilisation du dispositif de mélange pour plus d'informations.

1. Sortir le flacon de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) du congélateur.
2. Charger le flacon sur le dispositif de mélange Dako Omnis Mixing Device.
3. Brancher le dispositif de mélange et s'assurer que le voyant d'état vert est allumé.
4. Sélectionner le programme "décongélation + mélange". **Important :** Les flacons conservés à une température **inférieure** à -25 °C doivent être décongelés (seulement) avant le chargement du flacon sur le dispositif de mélange Dako Omnis et le programme "Mélange" doit être utilisé.
5. Retirer le flacon du dispositif de mélange.
6. Ouvrir le bouchon à charnière, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche (consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis).
7. Charger immédiatement le flacon sur le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) de l'instrument Dako Omnis. Si la fonction de chargement du réactif en continu

est utilisée au cours du cycle de coloration, s'assurer que le temps entre le mélange et l'aspiration du flacon sur l'instrument Dako Omnis est d'au moins 10 minutes.

La sonde *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) peut être recongelée et utilisée jusqu'à 10 fois.

Veiller à toujours mélanger la sonde *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) juste avant de la charger sur l'instrument. Ne pas la secouer. La stabilité totale de *ISH HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après le chargement sur l'instrument Dako Omnis, *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) doit immédiatement être ramené à une température inférieure à -18 °C (une température comprise entre -18 °C et -25 °C est recommandée).

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Préparer une solution de travail en diluant au 1/20e la ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) comme suit :

1. Remplir une bouteille en gros volume Dako Omnis de 3,5 L, désignée par une étiquette bleue (tampon PT), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Vider un flacon de 175 mL de concentré de ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide en gros volume.
3. Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille de liquide en gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille de liquide en gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
4. Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille de liquide en gros volume).
5. Charger immédiatement la bouteille en gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée sur le Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). La solution diluée restante peut être conservée entre 2 et 8°C pendant 30 jours. Une fois sortie du réfrigérateur, la solution diluée doit être équilibrée à 18 °C minimum avant son chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE : Jeter la solution diluée si elle présente un aspect trouble.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Préparer une solution de travail en diluant au 1/20ème le tampon concentré ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) comme suit :

1. Remplir une bouteille en gros volume Dako Omnis de 3,5 L, désignée par une étiquette bleue (tampon PT), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille de liquide sur une surface horizontale avant le remplissage.
2. Vider un flacon de 175 mL de concentré de ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille de liquide en gros volume.
3. Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille de liquide en gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille de liquide en gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
4. Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille de liquide en gros volume).
5. Charger immédiatement la bouteille de liquide de rinçage en gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée sur le Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). La solution diluée restante peut être conservée à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 30 jours. Après sortie du réfrigérateur, s'assurer que la solution diluée est équilibrée à au moins 18 °C avant le chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE : Jeter la solution diluée si elle présente un aspect trouble.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

La ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur l'instrument Dako Omnis, ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après la fin du cycle, la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) peut être amenée à une température de stockage (entre 2 et 8 °C) afin de préserver le temps de stabilité sur l'appareil.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

La solution ISH Pepsin (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur l'instrument Dako Omnis, s'assurer que le réactif est décongelé et ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsqu'elle est conservée dans le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs) du Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis (voir ci-dessus). Après la fin du cycle, la solution ISH Pepsin (Dako Omnis) doit être amenée à une température de stockage comprise entre -18 et 8 °C afin de préserver le temps de stabilité sur l'instrument.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Le milieu de montage Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) est un produit prêt à l'emploi à utiliser hors de l'instrument Dako Omnis. Amener le Fluorescence Mounting Medium à température de conservation (entre 2 et 8 °C) immédiatement après utilisation.

A.7 Accessoires supplémentaires

Les accessoires suivants doivent en outre être chargés sur l'instrument Dako Omnis : eau déionisée, tampon dilué Wash Buffer 20x (Dako Omnis), réf. GC807, Clearify™, réf. GC810, ISH Cleaning Solution, réf. GC207 et ISH Lid (Dako Omnis), réf. GC102 comme indiqué dans le Guide d'utilisation du Dako Omnis.

B. Procédure de coloration – Estomac

B.1 Remarques sur la procédure

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) est une sonde d'hybridation pour le test automatisé d'hybridation in situ en fluorescence directe (FISH) sur l'instrument Dako Omnis. Utilisée avec les réactifs accessoires GM300, GM301, GM302, GM303 et GM304 (GM304 en dehors de l'instrument), elle permet de déterminer quantitativement l'amplification du gène *HER2*. Avant l'utilisation, l'utilisateur doit lire attentivement toutes les instructions et se familiariser avec tous les composants et les précautions d'emploi.

La procédure automatisée sur l'instrument Dako Omnis inclut le déparaffinage **des** coupes de tissus, la restauration des cibles, la digestion par la pepsine, l'hybridation et le lavage stringent. Les lames sont déchargées dans la Unloading Station (Station de déchargement) sèche. Toutes les étapes du protocole sont pré-programmées dans le logiciel Dako Omnis.

Consulter le(s) Guide(s) d'utilisation du Dako Omnis pour obtenir des instructions sur le chargement des lames, le couvercle HIS, les réactifs, etc. Trois protocoles IQFISH validés pour *HER2* — le protocole *HER2* IQFISH Pepsin court, le protocole *HER2* IQFISH Pepsin moyen et le protocole *HER2* IQFISH Pepsin long, qui diffèrent uniquement par le temps de digestion par la pepsine, sont pré-programmés dans le logiciel Dako Omnis et peuvent être sélectionnés pour chacune des cinq lames dans le portoir à lames. Cela permet d'optimiser la digestion des tissus qui peut varier en fonction des conditions pré-analytiques. Le protocole IQFISH Pepsin moyen est considéré comme le protocole standard. Les différents protocoles de coloration peuvent être consultés sur la station de travail Dako Link Omnis.

B.2. Procédure de pré-coloration

1. Choisir le protocole *HER2* IQFISH à appliquer pour chaque lame à partir du logiciel de la station de travail Dako Link Omnis, sous Protocoles IQFISH.
2. Imprimer les étiquettes des lames et les apposer sur les lames de verre.
3. Placer les lames dans le portoir à lames. Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus d'informations. Un portoir à lames peut contenir une à cinq lames. Il est recommandé de colorer au moins deux lames lors d'un cycle de coloration *HER2* IQFISH.
4. Charger le portoir à lames sur l'instrument Dako Omnis.
5. Charger le couvercle HIS (un couvercle HIS par portoir à lames) sur l'instrument Dako Omnis.
6. Vérifier que les bouteilles de liquide de rinçage en gros volume sont chargées et enregistrées par l'instrument Dako Omnis. Bouteilles de liquide de rinçage en gros volume : Clearify™ (agent d'élimination), la solution ISH Pre-Treatment Solution diluée (Dako Omnis), la solution ISH Stringent Wash Buffer diluée (Dako Omnis) et le tampon de lavage dilué (Dako Omnis).
7. Charger la ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) et la solution ISH Pepsin (Dako Omnis), le *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) qui vient d'être mélangé et la ISH Cleaning Solution sur le Reagent Storage Module (Module de conservation des réactifs). Vérifier que tous les bouchons à charnière sont ouverts.
8. Suivre les instructions qui apparaissent sur l'écran tactile et appuyer sur "Done" (Terminé) pour lancer la procédure de coloration.

B.3. Procédure de coloration

La procédure de coloration *HER2* IQFISH sur l'instrument Dako Omnis (récapitulée dans le tableau 11) peut être suivie sur la station de travail Dako Link Omnis :

Tableau 11. Présentation simplifiée des étapes du protocole de coloration *HER2*.

Étape	Réactif	Durée et température
Déparaffinage	Clearify™ (agent d'élimination)	10 minutes à 38 °C
Restauration des cibles	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 minutes, à 97 °C
Lavage	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 x 3 minutes à 32 °C
Digestion*	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10 minutes, 15 minutes ou 20 minutes
Séchage		15 minutes, à 45 °C
Dénaturation		10 minutes, à 66 °C
Hybridation	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)	75 minutes, à 45 °C
Lavage stringent	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 minutes, à 61 °C

* Trois temps de digestion par la pepsine validés peuvent être choisis en utilisant les protocoles *HER2* IQFISH mentionnés ci-dessus.

Si aucune autre coloration HIS n'est prévue dans l'immédiat, rétablir la température de conservation recommandée pour tous les réactifs.

B.4. Procédure de post-coloration

Décharger les lames et appliquer jusqu'à 30 µL de Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) contenant du DAPI sur la zone cible de la lame. La coupe de tissu doit être entièrement recouverte de Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis). Appliquer une lamelle de protection en verre.

REMARQUE : Les lames peuvent être analysées 15 minutes après le montage ou dans les 7 jours suivant le montage. Toutefois, une décoloration se produit si les lames sont exposées à la lumière ou à des températures élevées. Pour minimiser la décoloration, conserver les lames à l'abri de la lumière entre -18 et 8 °C.

Contrôle de qualité – Estomac

1. Les signaux doivent être de couleur vive, bien distincts et faciles à évaluer.
2. Les cellules saines permettent un contrôle interne du cycle de coloration.
 - Les cellules normales doivent montrer un à deux signaux verts clairement visibles indiquant que la sonde PNA pour CEN-17 a réussi l'hybridation de la région centromérique du chromosome 17.
 - Les cellules normales doivent aussi montrer un à deux signaux rouges clairement visibles indiquant que la sonde ADN *HER2* a réussi l'hybridation des gènes *HER2*.
 - En raison du sectionnement des tissus, certaines cellules normales présenteront moins de deux signaux de chaque couleur.
 - L'absence de détection de signaux dans les cellules normales indique que le test a échoué et les résultats doivent être considérés comme non valides.
3. La morphologie nucléaire doit être intacte lors d'une évaluation à l'aide d'un filtre DAPI. La présence de nombreuses cellules fantômes et une mauvaise morphologie nucléaire générale indiquent une digestion trop forte de l'échantillon, ce qui peut avoir pour effet une perte ou une fragmentation des signaux. Ces échantillons doivent être considérés comme non valides.
4. Le nombre minimum de cellules tumorales pour l'évaluation est de 20.
5. Des différences dans la fixation, le traitement ou l'inclusion du tissu au niveau du laboratoire de l'utilisateur peuvent produire des variations significatives dans les résultats, ce qui exige une évaluation régulière des contrôles internes.

Interprétation de la coloration – Estomac

Tissus pouvant être évalués

Localiser la tumeur dans le contexte de la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine et évaluer la même zone sur la lame colorée par la procédure FISH (dans le filtre DAPI). Seuls les échantillons de patients issus d'un adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne doivent être évalués. Dans les cas de métaplasie intestinale et d'adénocarcinome gastrique dans le même échantillon, seule la composante adénocarcinome gastrique doit être évaluée. Éviter les zones présentant une forte inflammation, une nécrose et celles où les limites nucléaires sont ambiguës. Ne pas inclure les noyaux nécessitant un jugement subjectif. Ne pas inclure les noyaux avec un signal de faible intensité et une coloration du bruit de fond non spécifique ou importante.

Commencer par une évaluation au microscope de la totalité de la coupe colorée par la procédure FISH et de la zone affectée sur la coupe colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, respectivement. Avant numération de la coupe colorée par la procédure FISH, noter la répartition globale du signal (homogène ou hétérogène) sur la feuille de décompte des signaux. En cas de répartition hétérogène, noter si on observe une amplification des cellules focalisée ou en mosaïque.

- 1) *Répartition homogène du signal*

En cas de répartition homogène du signal, compter le nombre de centromères chromosomiques (signaux verts) et le nombre de gènes *HER2* (signaux rouges) dans 20 cellules d'une ou deux zones représentatives de la tumeur.

2) Répartition hétérogène du signal

En cas de répartition hétérogène du signal, compter 20 cellules des zones sélectionnées, comme précisé ci-dessous :

- A) S'il existe une amplification focalisée, sélectionner les zones avec des cellules amplifiées.
- B) S'il existe une répartition en mosaïque ou amplifiée, avec présence de cellules à polysomes et disomes, effectuer le décompte dans les zones à cellules amplifiées. Dans ces zones, il faut compter non seulement les cellules amplifiées mais également les cellules non amplifiées adjacentes pour un total de 20 cellules.

Si possible, ne pas sélectionner de zones se chevauchant.

Non-considération de la coloration de l'ADN bactérien

Un certain nombre de cellules spécialisées (mastocytes et macrophages), dispersées dans le tissu gastrique, montrent un degré de coloration élevé avec la sonde *HER2* en raison de la présence d'ADN bactérien. Les cellules sont colorées en rouge, très fluorescentes, et se distinguent clairement des cellules tumorales avec une amplification importante du gène *HER2*.

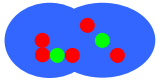


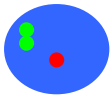
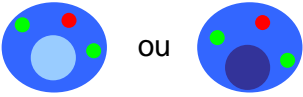

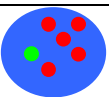
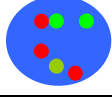

Numération des signaux

Lorsqu'une zone a été sélectionnée pour l'évaluation des signaux, commencer l'analyse dans l'un des 20 noyaux voisins choisis, puis effectuer le décompte cellule par cellule, en n'ignorant que les noyaux ne répondant pas aux critères de qualité. Localiser la tumeur dans le contexte de la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine et évaluer la même zone sur la lame colorée par la procédure FISH. Passer en revue l'intégralité de la lame colorée afin de juger d'une hétérogénéité éventuelle. Sélectionner une zone présentant une bonne répartition des noyaux. Commencer l'analyse dans le quart supérieur gauche de la zone sélectionnée en scannant de gauche à droite, compter le nombre de signaux dans les limites nucléaires de chaque noyau évalué conformément aux directives ci-dessous (voir aussi l'Annexe 5).

- Régler la mise au point pour trouver tous les signaux dans chaque noyau.
- Compter deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comme un seul signal. La distance doit être au moins égale au diamètre d'un signal de taille normale, pour pouvoir compter deux signaux comme des signaux distincts. Lorsque la distance entre deux signaux est inférieure au diamètre d'un signal, ils doivent être comptés comme un seul signal.
- Dans les noyaux avec une forte amplification du gène *HER2*, les signaux *HER2* peuvent être placés très proches les uns des autres et former un agrégat de signaux. Dans ce cas, il est impossible de compter le nombre de signaux *HER2* mais il doit être estimé. Faire particulièrement attention aux signaux verts car les agrégats de signaux rouges *HER2* peuvent couvrir les signaux verts et les rendre impossible à voir. En cas de doute, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique.

Ne pas évaluer les noyaux sans signaux ou avec des signaux d'une seule couleur. Évaluer uniquement les noyaux avec un ou plusieurs signaux FISH de chaque couleur.

Guide de décompte des signaux

1		Ne pas compter. Les noyaux se chevauchent, toutes les zones des noyaux ne sont pas visibles.
2		Deux signaux verts, ne pas évaluer les noyaux avec des signaux d'une seule couleur.
3		Compter comme 3 signaux verts et 12 signaux rouges (estimation d'agrégat).
4		Compter comme 1 signal vert et 1 signal rouge. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
5		Ne pas compter (noyaux surdigérés ou sous-digérés). Signaux manquants dans le centre des noyaux (noyaux en forme d'anneau).
6		Compter comme 2 signaux verts et 3 signaux rouges. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
7		Compter comme 1 signal vert et 5 signaux rouges.
8		Compter comme 3 signaux verts (1 vert flou) et 3 signaux rouges.
9		Agrégat de signaux rouges cachant les signaux verts, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique ou ne pas compter.

Noter le décompte des signaux dans un tableau comme celui donné dans les Annexes 3 et 4.

Compter 20 noyaux par échantillon tissulaire, avec des échantillons issus si possible de zones tumorales distinctes.

Calculer le rapport *HER2/CEN-17* en divisant le nombre total de signaux *HER2* rouges par le nombre total de signaux *CEN-17* verts.

Les échantillons avec un rapport *HER2/CEN-17* supérieur ou égal à 2 doivent être considérés comme présentant un gène *HER2* amplifié (29).

Les résultats à la limite ou proche de la limite (1,8-2,2) doivent être interprétés avec prudence.

Si le rapport est proche de la limite (1,8-2,2), compter 40 noyaux de plus et calculer le rapport pour les 40 noyaux. Si le décompte continue à se montrer limite, le résultat de la seconde évaluation est considéré comme valide. Si elle est possible, la coloration immunohistochimique de l'*HER2* doit être effectuée pour une meilleure orientation au cours du second décompte.

En cas de doute, la lame d'échantillon doit être réévaluée. Pour les cas limites, une consultation entre le pathologiste et le médecin traitant est recommandée.

Limites – Estomac

1. Pour une utilisation automatisée sur les instruments Dako Omnis uniquement.
2. Une formation spécialisée est nécessaire pour la préparation des tissus et des lames et pour l'interprétation de la coloration IQFISH. L'interprétation des colorations *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ne doit pas être assurée par des personnes présentant un trouble de la vision des couleurs.
3. Les résultats de l'analyse FISH dépendent de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Une fixation, un lavage, un séchage, un chauffage ou une coupe incorrects, ou bien une contamination par d'autres tissus ou fluides peuvent avoir une influence sur l'hybridation de la ou des sonde(s). Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ou à des irrégularités inhérentes au tissu.

Performances – Estomac

Effacité de l'hybridation

L'efficacité de l'hybridation du *HER2* IQFISH pharmDx™ a fait l'objet d'une étude sur 180 coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol testées sur trois sites de l'étude. Les 180 coupes de tissus peuvent être énumérées en fonction des consignes de décompte de produits. L'efficacité de l'hybridation était de 100%.

Les rapports *HER2/CEN-17* calculés et utilisés dans les études de performances sont basés sur un comptage des signaux dans 20 noyaux en utilisant les recommandations d'évaluation indiquées dans la section Interprétation de la coloration de ce mode d'emploi.

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a fait l'objet d'une étude avec 20 échantillons d'adénocarcinome de l'estomac (10 échantillons au statut du gène *HER2* amplifié et 10 échantillons non amplifiés). Le rapport entre le nombre de signaux *HER2* et CEN-17 a été calculé sur la base du décompte de 20 noyaux provenant de cellules normales dans l'échantillon tissulaire. Le rapport *HER2/CEN-17* pour les 20 échantillons tissulaires d'adénocarcinome de l'estomac était entre 0,94 et 1,19.

Spécificité analytique

Les sondes ADN *HER2* dans *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ont été séquencées à la fin et mises sur une carte pour confirmer une couverture totale de 218 kb comprenant le gène *HER2*.

Les sondes PNA pour CEN-17 dans *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ont été testées individuellement et ensemble pour confirmer leur hybridation spécifique à la région centromérique du chromosome 17.

Pour exclure toute hybridation croisée des chromosomes autres que le chromosome 17, des études ont été menées sur les étalements de métaphases en suivant les procédures standard de CQ de Dako. Un total de 275 étalements de métaphases aux signaux distincts a été évalué pour l'hybridation spécifique des mélanges de sondes ADN pour *HER2* et PNA pour CEN-17. Dans les 275 cas, l'hybridation était spécifique au chromosome 17. Aucune hybridation croisée sur les loci d'autres chromosomes n'a été observée dans les 275 cas. La spécificité des sondes était ainsi de 100% (275 sur 275).

Pour mesurer la capacité du test IQFISH à identifier uniquement les substances ciblées *HER2* et CEN-17 sans aucune interférence de la part d'autres substances, des études ont été menées sur des échantillons d'adénocarcinome gastrique en omettant les sondes *HER2* et CEN-17 du mélange d'hybridation et uniquement en utilisant le tampon d'hybridation. En tout, 20 échantillons ont été évalués pour vérifier l'absence de signaux non associés au mélange de sondes. Aucune détection d'autres cibles de chromosomes ou aucune interférence avec des substances étroitement liées n'a été observée dans les 20 échantillons.

Études de robustesse

La robustesse du test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée en variant la concentration de la sonde PNA, la durée de restauration des cibles, la durée d'incubation de la pepsine, la durée de dénaturation, la durée d'hybridation, ainsi que la durée et la température du lavage stringent. Les paramètres ont été testés sur trois échantillons tissulaires d'adénocarcinome gastrique inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE) et deux échantillons tissulaires FFPE provenant de la jonction gastro-œsophagienne (les échantillons tissulaires amplifiés et non amplifiés étaient représentés dans chaque groupe).

Tous les paramètres ont été testés en dessous et au-dessus des paramètres de protocole standard à l'exception de la concentration de la sonde PNA et de la température du lavage stringent, auxquelles le paramètre de protocole standard a été inclus dans le paramétrage.

Les paramètres de test sont les suivants :

Concentration de la sonde PNA : Testée à 100% et +/- 17%.

Durée de restauration des cibles : Testée à 13 min 45 s et 16 min 15 s.

Durée d'incubation de la pepsine : Testée à 14 min 45 s et 16 min 15 s.

Durée de dénaturation : Testée à 9 min 45 s et 10 min 45 s.

Durée d'hybridation : Testée à 70 min et 80 min.

Durée du lavage stringent : Testée à 8 min 45 s et 11 min 15 s.

Température du lavage stringent : Testée à 59 °C, 61 °C et 63 °C.

Les trois concentrations de la sonde PNA ont été évaluées dans un plan d'expérience fractionné (outil JMP, SAS), qui a été exécuté avec 12 protocoles de coloration, comme indiqué dans le tableau 12.

Tableau 12. Douze protocoles de coloration sont utilisés dans l'étude de robustesse.

Numéro du protocole de robustesse	Paramètre de test						
	Durée de restauration des cibles (min)	Durée d'incubation de la pepsine (min)	Durée de dénaturation (min)	Durée d'hybridation (min)	Durée du lavage stringent (min)	Température du lavage stringent (°C)	Concentration PNA dans le mélange de sondes
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Les cinq échantillons tissulaires ont été colorés à l'aide des 12 protocoles.

L'étude de robustesse affichait l'intensité du signal et la qualité morphologique. Tous les protocoles ont produit une coloration dans tous les échantillons tissulaires (60 au total) avec des signaux de couleur vive, bien distincts et faciles à évaluer, ce qui permet de les décompter.

Qui plus est, l'effet de l'épaisseur tissulaire sur les résultats du test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testé en variant l'épaisseur de coupe des échantillons tissulaires d'adénocarcinome de l'estomac FFPE.

Cinq coupes consécutives d'échantillons d'adénocarcinome gastrique de différentes épaisseurs (2, 3, 4, 5, 6 et 7 µm) ont été testées avec *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). Le coefficient moyen de variation du rapport *HER2*/CEN-17 était de 3,9% (entre 3,2% et 5,0%).

Reproductibilité

La reproductibilité d'un jour à l'autre et de lot à lot en laboratoire a été testée à l'aide du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis). Cette étude a été conçue comme une étude interne, en aveugle et randomisée des rapports *HER2*/CEN-17 sur des coupes provenant de huit échantillons de cancers de l'estomac inclus en paraffine, fixés au formol, y compris la jonction gastro-œsophagienne, avec divers niveaux de l'amplification du gène *HER2*. Les huit échantillons avaient été testés avec HercepTest™ et représentaient deux échantillons avec *HER2* IHC 0/1+, deux échantillons avec *HER2* IHC 2+, deux échantillons avec *HER2* IHC 3+ et deux échantillons avec le rapport pré-déterminé *HER2*/CEN-17 FISH entre 1,5 et 2,5 obtenu à l'aide du *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731). Chaque échantillon était coloré à l'aide de trois lots différents de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) sur cinq jours non consécutifs. 240 colorations tissulaires ont été traitées au total pour toute l'étude dans la mesure où chaque combinaison était colorée en double. La Figure 8 illustre les écarts entre les rapports en fonction des jours et des lots. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox par le biais d'un modèle d'effet aléatoire pour obtenir une homogénéité de variation entre les données. Le coefficient total de variation était estimé

à 6,5%. La variation entre les jours et les lots y a contribué à hauteur de 0,7% et 0,8%, respectivement.

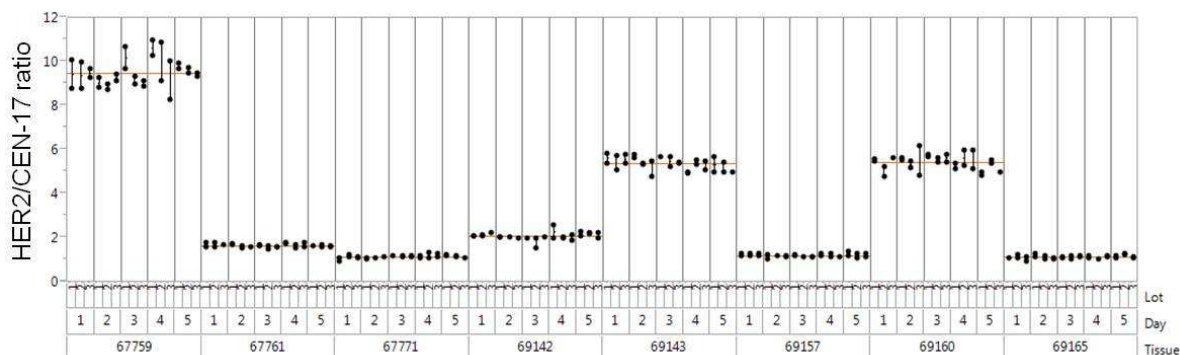


Figure 8. Rapports *HER2*/CEN-17 obtenus dans une étude de reproductibilité en laboratoire sur *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), y compris les résultats finaux de reproductibilité de lot à lot et d'un jour à l'autre. La valeur médiane pour chaque échantillon tissulaire est illustrée par une ligne horizontale.

Qui plus est, la reproductibilité inter-jours et intersites de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée en externe dans une étude sur trois sites (un site aux États-Unis et deux sites en Europe), stratifiée et en aveugle sur des coupes tissulaires provenant de 12 échantillons d'adénocarcinome gastrique inclus en paraffine, fixés au formol, y compris la jonction gastro-œsophagienne. Trois échantillons étaient *HER2* IHC 0/1+, trois échantillons étaient *HER2* IHC 2+, trois échantillons étaient *HER2* IHC 3+ et trois échantillons avaient le rapport pré-déterminé *HER2*/CEN-17 FISH entre 1,5 et 2,5 obtenu à l'aide du HercepTest™ et du *HER2* IQFISH pharmDx™ (réf. K5731), respectivement. Les échantillons étaient colorés et analysés sur les sites de l'étude. Chaque échantillon était coloré au moins sept fois sur sept jours non consécutifs et évalué par un observateur sur chaque site. 314 coupes étaient colorées et comprises dans l'analyse statistique. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox et les composants de variation ont été calculés. Le coefficient total de variation basé sur la limite supérieure de confiance à 95% était de 24%. La variation du rapport *HER2*/CEN-17 inter-jours et intersites est illustrée sur la Figure 9.

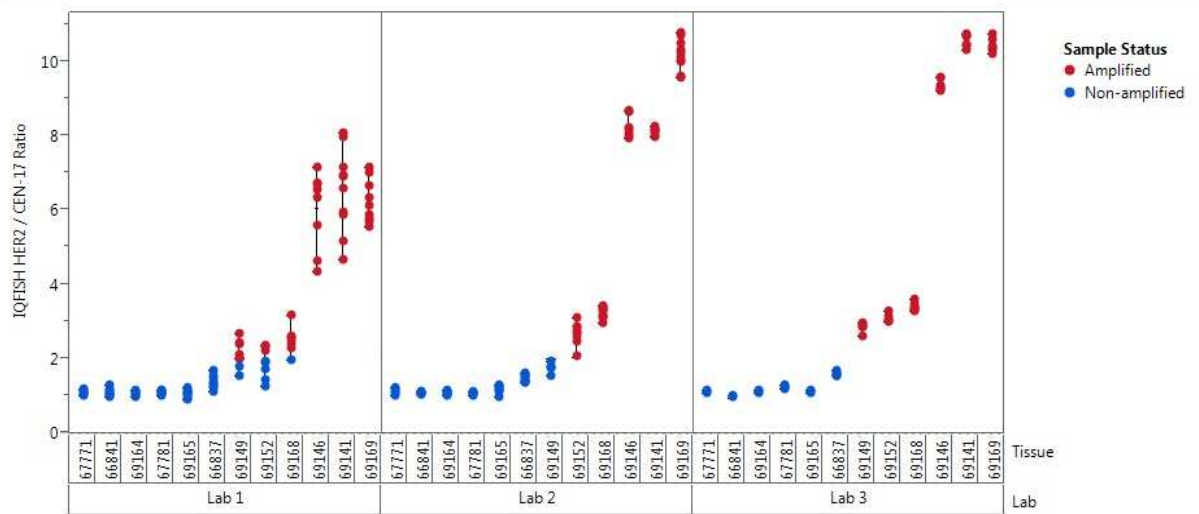


Figure 9. Tableau de variation des rapports *HER2*/CEN-17 dans les unités non transformées et obtenues dans l'étude de reproductibilité inter-jours et intersites du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) sur les échantillons tissulaires d'adénocarcinome de l'estomac.

Le test *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été mené pour la reproductibilité d'observateur à observateur dans le cadre d'une étude comparative interne avec trois observateurs pour évaluer indépendamment les échantillons colorés. La reproductibilité a été testée sur 139 échantillons d'adénocarcinome gastrique au statut de gène *HER2* non amplifié ou amplifié. Les données ont été analysées à l'aide d'une transformation de Box-Cox. Le coefficient moyen de variation pour la reproductibilité d'observateur à observateur était de 18%. Les échantillons d'adénocarcinome gastrique portaient sur 96,4% de résections et 5,6% d'échantillons de biopsies. 81,3% des échantillons sont obtenus à partir de l'estomac et 18,7% de la jonction gastro-œsophagienne.

Répétabilité

La répétabilité en laboratoire du *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) a été testée avec des coupes consécutives de huit échantillons d'adénocarcinome gastrique au statut de gène *HER2* non amplifié ou amplifié. Les tissus ont été testés en double sur cinq jours non consécutifs avec trois lots différents dans 240 coupes au total (120 coupes en double). Le modèle d'effet aléatoire utilisé pour analyser les données s'est soldé par une variation attribuable aux jours et aux lots (voir l'étude de reproductibilité interne ci-dessus). La variation résiduelle correspond à la variation entre les reproductions et donc la répétabilité. La limite supérieure de confiance à 95% pour le coefficient de répétabilité de la variation était de 7,1%.

Étude comparative

Comparaison de *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) à *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731)

Cette étude portait sur 140 échantillons de cancers de l'estomac constitués de plusieurs types de tissus d'adénocarcinome gastrique, à savoir l'estomac ou la jonction gastro-œsophagienne, et les résections ou biopsies avec une répartition du signal homogène ou hétérogène (focalisé ou en mosaïque), comme illustré dans le tableau 13.

Cancer de l'estomac

Tableau 13. Répartition des échantillons par type de cancer gastrique (estomac ou jonction gastro-œsophagienne), catégorie de répartition du signal (homogène ou hétérogène) et type de tissus (résection ou biopsie).

Type de cancer gastrique	Nombre d'échantillons	Répartition du signal	Nombre d'échantillons	Type de tissus	Nombre d'échantillons
Estomac	113	Homogène	58	Résection	134
Jonction gastro-œsophagienne	27	Hétérogène - Focalisé	61	Biopsie	6
		Hétérogène - En mosaïque	21		
Total	140	Total	140	Total	140

Les échantillons étaient constitués de 76 cas de non amplification du gène *HER2* et de 64 cas d'amplification du gène *HER2* avec une évaluation HercepTest™ connue, comme l'illustre le tableau Table 14.

Tableau 14. Répartition des échantillons en fonction des évaluations HercepTest™ et *HER2* FISH obtenues avec le kit *HER2* FISH pharmDx™ (réf. K5731).

Évaluation de coloration HercepTest™	0	1+	2+	3+	Total
n	39	14	45	42	140
Statut du gène <i>HER2</i> FISH					
Amplifié	4	1	19	40	64
Non amplifié	35	13	26	2	76
Total des échantillons testés par FISH	39	14	45	42	140

Le Table 15 présente les résultats de tabulation croisée du statut de gène *HER2* obtenus à la suite de deux tests calculant le pourcentage de concordance globale, le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative. La Figure 10 présente la corrélation entre les rapports *HER2*/CEN-17 à l'aide de ces deux tests.

Tableau 15. Tabulation croisée du statut de gène *HER2* obtenue à l'aide des kits *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731) et *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis).

		Statut de gène <i>HER2</i> (K5731)		Total
		Non amplifié	Amplifié	
Statut de gène <i>HER2</i> (Dako Omnis)	Non amplifié	76	1	77
	Amplifié	0	63	63
Total		76	64	140
Pourcentage de concordance globale : 99,3% Pourcentage de concordance positive : 98,4% Pourcentage de concordance négative : 100%				

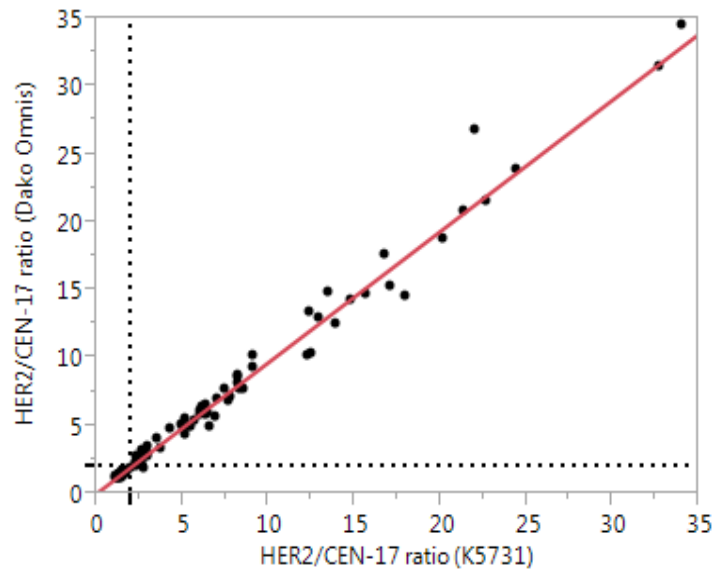


Figure 10. Corrélation entre les rapports HER2/CEN-17 à l'aide de *HER2 FISH pharmDx™* (Dako Omnis) et *HER2 IQFISH pharmDx™* (réf. K5731) sur 140 échantillons de cancers de l'estomac (introduction linéaire : $y = 0,06 + 0,97 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. Pondération avec une variation inverse pour autoriser une introduction linéaire).

L'intervalle de confiance à 95% pour l'écart moyen entre les deux méthodes de coloration sur le rapport *HER2/CEN-17* = 2 était de [0,007 ; 0,022]. En d'autres termes, un écart supérieur à 2% n'est pas prévu.

Données cliniques

La sécurité clinique et l'efficacité du trastuzumab (Herceptin™) ont été démontrées dans l'étude BO18255 (essai ToGA "Une étude multicentrique, randomisée, en ouvert, de phase III visant à évaluer le trastuzumab en association avec un traitement à base de fluoropyrimidine et cisplatine (capécitabine ou 5-fluorouracil) (FC+H) contre une chimiothérapie seule (FC) en traitement de première intention chez les patients atteints d'un cancer de l'estomac HER2-positif à un stade avancé") (28). Cette étude a été conçue comme une étude multicentrique, randomisée, en ouvert, de phase III portant sur des patients positifs à la HER2, atteints d'adénocarcinomes de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne à un stade avancé. Dans l'étude BO18255, la positivité à l'HER2 a été définie comme IHC-positif (3+) à l'aide de HercepTest™ (Dako) et/ou FISH positif (*HER2/CEN-17* $\geq 2,0$) à l'aide du kit *HER2 FISH pharmDx™* (Dako). Après leur enrôlement dans l'étude, les patients recevaient de manière aléatoire une chimiothérapie (5-FU ou capécitabine et cisplatine) ou une chimiothérapie plus du trastuzumab.

Le principal résultat de l'étude sur l'efficacité du traitement portait sur la survie globale (SG) analysée par le test stratifié consistant à évaluer l'égalité des fonctions de survie. L'analyse finale de SG basée sur 351 décès était statistiquement significative (niveau nominal d'importance de 0,0193). Une mise à jour de l'analyse de SG a également eu lieu un an après l'analyse finale. La survie globale médiane de 13,5 mois suite à un traitement par Herceptin™ + chimiothérapie était nettement plus longue comparée à la survie globale médiane de 11,0 mois suite à une chimiothérapie uniquement. Les résultats d'efficacité des analyses finale et mise à jour ont été récapitulés dans le tableau 16 et sur la figure 11.

Tableau 16. Survie globale chez la population ITT (en intention de traiter).

	FC N = 296	FC + H N = 298
Survie globale finale		
N° Décès (%)	184 (62,2%)	167 (56,0%)
Médiane	11,0	13,5
IC à 95% (en mois)	(9,4, 12,5)	(11,7, 15,7)
Taux de risque	0,73	
IC à 95%	(0,60, 0,91)	
valeur p*, bilatéral	0,0038*	
Survie globale mise à jour		
N° Décès (%)	227 (76,7%)	221 (74,2%)
Médiane	11,7	13,1
IC à 95% (en mois)	(10,3, 13,0)	(11,9, 15,1)
Taux de risque	0,80	
IC à 95%	(0,67, 0,97)	

*Comparaison avec le niveau nominal d'importance de 0,0193

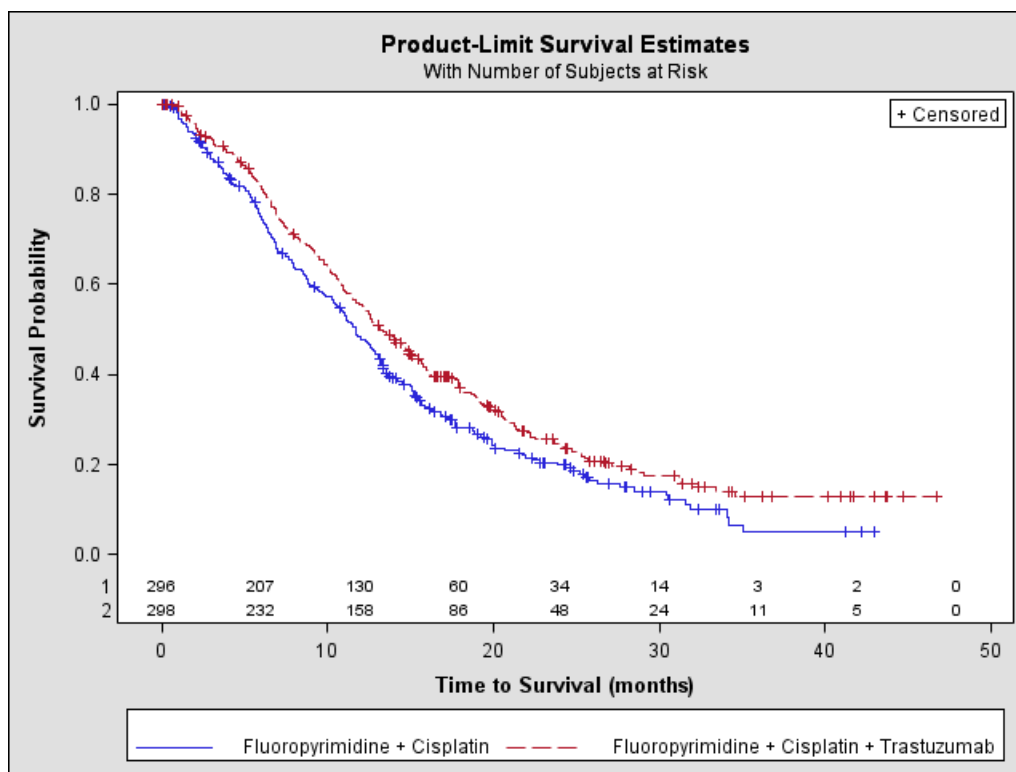


Figure 11. Survie globale mise à jour chez les patients atteints d'un cancer de l'estomac métastatique

Le tableau 17 récapitule l'analyse exploratoire de la SG en fonction des tests de l'amplification des gènes (FISH) et de la surexpression des protéines (IHC).

Tableau 17. Analyses exploratoires par statut HER2 avec les résultats de survie globale mise à jour.

	FC N = 296^a	FC+H N = 298^b
Sous-groupe FISH+ / IHC 0, 1+ (N = 133)		
N° Décès / n (%)	57/71 (80,3%)	56/62 (90,3%)
Durée SG médiane (sgm)	8,8	8,3
IC à 95% (sgm)	(6,4, 11,7)	(6,2, 10,7)
Taux de risque (IC à 95%)	1,33 (0,92, 1,92)	
Sous-groupe FISH+ / IHC2+ (N = 160)		
N° Décès / n (%)	65/80 (81%)	64/80 (80%)
Durée SG médiane (sgm)	10,8	12,3
IC à 95% (sgm)	(6,8, 12,8)	(9,5, 15,7)
Taux de risque (IC à 95%)	0,78 (0,55, 1,10)	
Sous-groupe FISH+ ou FISH-/IHC3+^c (N = 294)		
N° Décès / n (%)	104/143 (73%)	96/151 (64%)
Durée SG médiane (sgm)	13,2	18,0
IC à 95% (sgm)	(11,5, 15,2)	(15,5, 21,2)
Taux de risque (IC à 95%)	0,66 (0,5, 0,87)	

La survie globale médiane a été estimée à partir des courbes Kaplan-Meier.

^a Deux patients traités par FC, avec FISH+ mais au statut IHC inconnu, étaient exclus des analyses.

^b Cinq patients traités par Herceptin™, avec FISH+ mais au statut IHC inconnu, étaient exclus des analyses.

^c Comprend 6 patients traités par chimiothérapie, 10 patients par Herceptin™, avec FISH-, IHC3+ et 8 patients traités par chimiothérapie, 8 patients par Herceptin™ au statut IHC inconnu, IHC3+.

Dépannage – Estomac

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
1. Pas de signal ou signaux faibles	<p>1a. Les réactifs ont été exposés à des températures élevées pendant le transport ou la conservation</p> <p>1b. Le microscope ne fonctionne pas correctement</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mauvais jeu de filtres - Mauvaise lampe - Lampe à mercure trop vieille - Lentilles du collecteur sales et/ou fissurées - Mauvaise huile d'immersion <p>1c. Signaux décolorés</p> <p>1d. Tampons mal identifiés</p>	<p>1a. Vérifier les conditions de conservation. S'assurer qu'il restait de la neige carbonique à la réception des colis contenant le mélange de sondes IQISH et la pepsine. S'assurer que les réactifs ont été conservés comme indiqué.</p> <p>1b. Vérifier le microscope et s'assurer que les filtres utilisés conviennent pour les fluorochromes du mélange de sondes et que la lampe au mercure est la bonne et qu'elle n'a pas été utilisée au-delà de sa durée de vie prévue (voir l'annexe 5). En cas de doute, contacter le distributeur local du microscope.</p> <p>1c. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition aux sources de lumière vive.</p> <p>1d. Remettre en place les tampons en gros volume et s'assurer qu'ils sont correctement enregistrés (sur la station de travail) et identifiés (sur l'écran tactile). Consulter le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus d'informations. Il convient de noter que la solution ISH Pre-Treatment Solution est verte et la solution ISH Stringent Wash Buffer est jaune.</p>
2. Zones sans signal	2. Bulles d'air prises durant le montage	2. Éviter la formation de bulles d'air. Si des bulles sont observées, les éliminer en tapotant doucement à l'aide de pinces.
3. Coloration de fond excessive	3a. Mauvaise fixation du tissu	3a S'assurer que seules des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol sont utilisées.

Cancer de l'estomac

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
	3b. Exposition prolongée de la coupe hybridée à une lumière vive	3b. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition à la lumière vive.
4. Mauvaise morphologie tissulaire	4a. Mauvais traitement à la pepsine	4a. Utiliser l'un des trois autres protocoles de coloration. S'assurer que la ISH Pepsin est conservée à la température recommandée.
	4b. Un traitement trop long à la pepsine ou des coupes très fines peuvent faire apparaître des cellules fantômes ou en forme d'anneau	4b. Essayer un protocole de coloration avec un temps d'incubation dans la pepsine plus court. S'assurer que l'épaisseur de coupe est comprise entre 3 et 6 µm.
5. Autofluorescence verte importante sur la lame, y compris dans les zones dépourvues de tissu FFPE	5. Utilisation de lames en verre périmées ou non recommandées.	5. Choisir des lames de verre comme spécifié. S'assurer que les lames en verre ne sont pas périmées.

REMARQUE : Si le problème ne peut être attribué à l'une des causes mentionnées ci-dessus, ou si l'action corrective échoue, contacter le service technique Dako pour obtenir de l'aide.

Annexe 3 – Estomac

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), réf. GM333

Feuille d'évaluation

Date du cycle : _____ ID du registre du cycle de coloration : _____

Lot HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) : _____ ID de l'échantillon : _____

Caractéristiques de la répartition du signal dans le tissu :

Homogène :

Hétérogène – Focalisée : ou Hétérogène – Mosaïque :

Comptage des signaux dans 20 noyaux					
N° noyau	Note HER2 (rouge)	Note CEN-17 (vert)	N° noyau	Note HER2 (rouge)	Note CEN-17 (vert)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total (1-10)			Total (11-20)		

Pour la détermination du rapport *HER2/CEN-17*, compter le nombre de signaux *HER2* et celui des signaux *CEN-17* sur les 20 mêmes noyaux, et diviser le nombre total de signaux *HER2* par le total de signaux *CEN-17*. Si le rapport *HER2/CEN-17* se trouve à la limite (1,8 à 2,2), compter 40 noyaux de plus et recalculer le rapport pour les 40 noyaux (se reporter au schéma d'évaluation pour le nouveau décompte, Annexe 4).

Un rapport à la valeur-seuil ou proche de la valeur-seuil (1,8-2,2) doit être interprété avec prudence (voir le guide de comptage).

	<i>HER2</i>	<i>CEN-17</i>	Rapport <i>HER2/CEN-17</i>
Score total (1 à 20)			

Rapport < 2 : Aucune amplification du gène *HER2* observée

Rapport ≥ 2 : Amplification du gène *HER2* observée

Date et signature du technicien : _____

Date et signature du pathologiste : _____

Pour les directives d'évaluation, voir la section Interprétation de la coloration.

Annexe 4 – Estomac

HER2 IQFISH pharmDx™, réf. GM333

Schéma d'évaluation du nouveau décompte

Date du cycle : _____ ID du registre du cycle de coloration : _____

Lot HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) : _____ ID de l'échantillon : _____

Signaux dans les 40 noyaux supplémentaires (1-40)											
Noyau N°	HER2 (rouge)	CEN17 (vert)	Noyau N°	HER2 (rouge)	CEN-17 (vert)	Noyau N°	HER2 (rouge)	CEN-17 (vert)	Noyau N°	HER2 (rouge)	CEN-17 (vert)
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Total (1-10)			Total (11-20)			Total (21-30)			Total (31-40)		

Pour la détermination du rapport HER2/CEN-17, compter le nombre de signaux HER2 et celui des signaux CEN-17 sur les 40 mêmes noyaux, et diviser le nombre total de signaux HER2 par le total de signaux CEN-17. **Indiquer le score total des noyaux 1 à 40 dans le tableau ci-dessous.**

	HER2	CEN-17	Rapport HER2/CEN-17
Score total (1 à 40)			

- Rapport < 2 : Aucune amplification du gène HER2 observée
- Rapport ≥ 2 : Amplification du gène HER2 observée

Date et signature du technicien : _____

Date et signature du pathologiste : _____

Pour les directives d'évaluation, voir la section Interprétation de la coloration.

Annexe 5 – Estomac

HER2 IQFISH pharmDx™, réf. GM333

Spécifications du microscope à fluorescence

Dako recommande l'équipement suivant pour une utilisation avec HER2 IQFISH pharmDx™, (Dako Omnis), GM333 :

1. Type de microscope

- Microscope à épifluorescence

2. Lampe

- Lampe à mercure de 100 watts (noter la durée d'utilisation)

3. Objectifs

- Pour la sélection des tissus, des objectifs à immersion à l'huile 16x ou 20x conviennent
- Pour un fort grossissement et la numération des signaux, seuls des objectifs à immersion à l'huile, p. ex. 100x, sont recommandés.

4. Filtres

Les filtres sont conçus individuellement pour des fluorochromes spécifiques et doivent être choisis en conséquence. Dako recommande l'utilisation d'un filtre DAPI spécifique combiné à un double filtre Texas Red/FITC de haute qualité.

- Filtre DAPI, p. ex. filtre Chroma réf. 31000
- Filtre double Texas Red/FITC, p. ex. filtre de Omega Optical réf. XF53 ou filtre de Chroma réf. 51006
- Les filtres Texas Red et FITC simples peuvent être utilisés pour la confirmation et la numération.

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Les filtres sont spécifiques à chaque type de microscope et l'utilisation des filtres appropriés est cruciale pour l'interprétation. Pour obtenir des informations détaillées, contacter le fournisseur du microscope ou votre représentant Dako.

5. Huile

- Huile non fluorescente

Précautions d'emploi

- L'emploi d'une lampe au mercure de 50 watts n'est pas recommandé
- Les filtres rhodamine ne peuvent pas être utilisés
- Les filtres triples ne sont pas recommandés

Un microscope non optimisé peut causer des problèmes pour la lecture des signaux fluorescents. Il est important que la source de lumière n'ait pas dépassé la date de péremption et qu'elle soit correctement alignée et centrée.

Les clients doivent contrôler et suivre les recommandations du fabricant concernant la lampe à mercure. Le microscope doit être maintenu et la lampe à mercure doit être dans l'alignement avant l'interprétation des résultats.

Tous les efforts doivent être faits pour exposer l'échantillon le moins possible à la lumière d'excitation pour minimiser la décoloration de la fluorescence.

Nous recommandons que vous discutiez du paramétrage de votre microscope particulier avant de commencer l'hybridation *in situ* fluorescente ou que vous vous reportiez à la documentation.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist die Hybridisierungssonde für den automatisierten In-situ-Hybridisierungssassay unter direkter Fluoreszenz (FISH) im Dako Omnis Gerät und ist, zusammen mit Zusatzreagenzien, vorgesehen für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Brustkrebsgewebeproben und FFPE-Proben von Patienten mit metastatischem Adenokarzinom des Magens, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs.

HER2 IQFISH pharmDx™ ist als Ergänzung zum HercepTest™ für die Bewertung von Patienten indiziert, für die eine Behandlung mit Herceptin™ (Trastuzumab) in Erwägung gezogen wird (siehe Herceptin™ Packungsbeilage).

Bei Brustkrebspatientinnen sind die *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Ergebnisse als Ergänzung zu den klinisch-pathologischen Informationen vorgesehen, die gegenwärtig für die Abschätzung der Prognose bei Brustkrebspatientinnen im Stadium II mit Lymphknotenbefall genutzt werden.

Gastrisches Adenokarzinom bzw. Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs werden in diesem Dokument auch als Magenkrebs bezeichnet.

Für Anwendungen bei Brustkrebs siehe Seite 106-130.

Für Anwendungen bei Magenkrebs siehe Seite 131-156.

Wichtig: Bei der Auswertung von angefärbten Gewebeschnitten bitte besonders die Unterschiede zwischen Brustkrebs- und Magenkrebsgewebe beachten.

Zusammenfassung und Erläuterung – Brustkrebs

Das humane *HER2*-Gen (auch *ERBB2* oder *NEU*) ist auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert das HER2-Protein bzw. p185^{HER2}. Als eine Membranrezeptor-Tyrosinkinase zeigt das HER2-Protein Rezeptorhomologie mit dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR oder HER1) (1-2). Das *HER2*-Gen liegt in allen normalen diploiden Zellen in 2 Kopien vor.

Bei einem gewissen Anteil von Patientinnen mit Brustkrebs erfolgt die Amplifikation des *HER2*-Gens als Bestandteil des Prozesses der malignen Transformation und der Tumorprogression (3-8). Generell führt die *HER2*-Genamplifikation zur Überexpression des HER2-Proteins auf der Oberfläche von Brustkrebszellen (9).

Bei 20-25% der Brustkrebsfälle wurde eine Amplifikation des *HER2*-Gens und/oder eine Überexpression seines Proteins nachgewiesen (10). Diese Up-Regulation geht einher mit schlechter Prognose, erhöhtem Rezidivrisiko und verkürzter Überlebenszeit. In mehreren Studien wurde aufgezeigt, dass der HER2-Status einen korrelativen Zusammenhang mit der Empfindlichkeit für oder der Resistenz gegen bestimmte Chemotherapieschemata aufweist (11).

Der Nachweis einer hohen Überexpression des HER2-Proteins oder der *HER2*-Genamplifikation ist für die Einleitung der Behandlung mit Herceptin™ – einem monoklonalen Antikörper gegen das HER2-Protein – unerlässlich. Klinische Studien haben den Nachweis erbracht, dass Patientinnen, deren Tumore eine starke Überexpression des HER2-Proteins und/oder Amplifikation des *HER2*-Gens zeigen, am meisten von der Behandlung mit Herceptin™ profitieren (12).

Dieses Produkt (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)) ist ein IQISH-Sondenmix für automatisierte, direkte FISH-Verfahren und erkennt *HER2*-Genamplifikationen. Dieses Produkt muss zusammen mit den spezifizierten Zusatzreagenzien im Dako Omnis Gerät verwendet werden und stammt vom manuell ausgeführten *HER2*-Genamplifikationsassay, *HER2* IQFISH pharmDx™, Code-Nr. K5731.

Prinzip des Testverfahrens – Brustkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist ein IQISH-Sondenmix bestehend aus einer Mischung von mit Texas Red markierten DNA-Sonden, die eine Region von 218 kb abdecken, einschließlich des *HER2*-Gens auf Chromosom 17 sowie einer Mischung aus Fluorescein-markierten PNA (13)-Sonden, die auf die Centromer-Region von Chromosom 17 (CEN-17) abzielen. Die spezifische Hybridisierung der beiden Ziele resultiert in der Bildung eines deutlichen roten Fluoreszenzsignals an jedem *HER2*-Genlokus und eines deutlich erkennbaren grünen Fluoreszenzsignals an jedem der Centromere von Chromosom 17.

Die *HER2*-Genamplifikationsbeurteilung mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist ein vollautomatisches Verfahren auf dem Dako Omnis Gerät. Über die Dako Link Omnis Workstation Software können drei verschiedene validierte *HER2*-FISH-Färbeprotokolle ausgewählt werden. Die Protokolle unterscheiden sich nur bezüglich der Andauungszeit mit Pepsin, wobei 10 Minuten (kurzes Protokoll), 15 Minuten (mittleres Protokoll) und 20 Minuten (langes Protokoll) ausgewählt werden können (siehe nähere Informationen weiter unten). Das mittlere Protokoll wird für die anfängliche Analyse empfohlen.

Nach der Färbung im Dako Omnis werden die Proben mit Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) (Fluoreszenz-Eindeckmedium) fixiert, das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthält, und mit einem Deckglas versehen. Mit einem mit den angemessenen Filtern (siehe Anhang 2) versehenen Fluoreszenz-Mikroskop werden die Tumorzellen lokalisiert und es erfolgt eine Auszählung der roten (*HER2*) und grünen (CEN-17) Signale. Daraufhin wird das *HER2*/CEN-17-Verhältnis berechnet. Im untersuchten Gewebeschnitt vorliegende normale Zellen dienen als interne Positivfärbekontrolle.

Weitere Einzelheiten siehe den Abschnitt über die Interpretation der Anfärbung.

Anweisungen zum Laden und Entladen von Objektträgern, ISH Lids (Dako Omnis), Reagenzien, Spülflüssigkeiten und Abfällen siehe Dako Omnis Handbücher.

Reagenzien – Brustkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die Zusatzreagenzien können separat als einzelne Reagenzien bestellt werden.

Mitgelieferte Materialien

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis): 1,6 mL, Ready-to-Use, Mischung von mit Texas Red markierten *HER2*-DNA-Sonden und Fluorescein-markierten CEN-17 PNA-Sonden in einem IQISH-Hybridisierungspuffer.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wird in Trockeneis verpackt ausgeliefert. **Um sicherzustellen, dass das Reagenz während des Transports keinen hohen Temperaturen ausgesetzt war, muss bei seiner Entgegennahme immer noch Trockeneis vorhanden sein.** Reagenzbehälter mit aufgetautem Inhalt müssen zu jeder Zeit in aufrechter Position gelagert oder verwendet werden.

Der Reagenzbehälter enthält ein goldbeschichtetes Metallkugelchen für das Mischen im Dako Omnis Mixing Device (siehe Dako Omnis Mixing Device Handbuch). Es ist wichtig, das Reagenz gründlich zu mischen, bevor es in das Dako Omnis geladen wird.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)

Zusatzreagenzien

Die folgenden Reagenzien sind im Dako Omnis Gerät für die *HER2*-Genamplifikationsanalyse mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) erforderlich:

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, 20-fach konzentriert; wird 1:20 in einer Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche (Code-Nr. GC109) verdünnt. Das Produkt enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff und einen inerten grünen Farbstoff, damit es einfacher erkennbar und anzuwenden ist.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL 96%iges Ethanol (Ready-to-Use).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL Pepsin A-Lösung (Ready-to-Use), pH 2,0; enthält einen Stabilisator und einen antimikrobiellen Wirkstoff. Pepsin wird in Trockeneis verpackt ausgeliefert. **Um sicherzustellen, dass das Reagenz während des Transports keinen hohen Temperaturen ausgesetzt war, muss bei seiner Entgegennahme immer noch Trockeneis vorhanden sein.**

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis): 175 mL Natriumzitatpuffer 20-fach konzentriert; wird 1:20 in einer Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche (Code-Nr. GC109) verdünnt. Das Produkt enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff, ein Reinigungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff, damit es einfacher erkennbar und anzuwenden ist.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0,8 mL Fluoreszenz-Eindeckmedium (Ready-to-Use) mit DAPI.

Obwohl diese oben aufgeführten Reagenzien im Lieferumfang von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) nicht enthalten sind, werden sie unten kurz beschrieben. Bitte die Gebrauchsanweisung für jedes Produkt für weitere Einzelheiten beachten.

Zusätzliche Reagenzien und Geräte

Dako Omnis, Code-Nr. GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), Code-Nr. GC807

Clarify™, Code-Nr. GC810

Dako Omnis Mixing Device, Code-Nr. GC116

ISH Lid, Code-Nr. GC102

ISH Cleaning Solution, Code-Nr. GC207

Deckgläser für die Eindeckung (24 mm x 50 mm)

Bitte das Dako Omnis Grundlegende Benutzerhandbuch und das Ausführliche Benutzerhandbuch für die Verwendung der zusätzlichen Reagenzien und Geräte beachten.

Mikroskopausstattung und Zubehör

Filter für das Fluoreszenz-Mikroskop: DAPI- und FITC-/Texas Red-Doppelfilter oder FITC- und Texas Red-Monofilter; weitere Einzelheiten siehe Anhang 2. Die Verwendung des DAPI-Filters mit großer Vergrößerung kann sich negativ auf die Signalintensität auswirken. Lange Expositionszeiten sind zu vermeiden.

Ein Fluoreszenz-Mikroskop mit einer 100-Watt-Quecksilberdampfampe als Lichtquelle ist zu empfehlen. Andere Lichtquellen werden für die Anwendung mit diesen Filtern nicht empfohlen.

Mappe für Mikroskop-Objektträger (Halter aus Pappe für 20 Objektträger mit beweglicher Klappe o.ä.).

Vorsichtsmaßnahmen – Brustkrebs

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für geschultes Fachpersonal.
3. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) enthält ≥ 10 - $< 25\%$ Ethylencarbonat und ≥ 3 - $< 5\%$ Natriumchlorid. *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) ist wie folgt gekennzeichnet:



Achtung

H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Augenschutz oder Gesichtsschutz tragen.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P305 + P351 + P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten.

Anwender sind gründlich und sorgfältig mit den Arbeitsverfahren, den gefährlichen Eigenschaften und den notwendigen Sicherheitsvorschriften vertraut zu machen. Zusätzliche Informationen siehe das Sicherheitsdatenblatt.

4. Gewebeproben müssen ebenso wie alle ihnen ausgesetzten Materialien vor und nach dem Fixieren in einer Weise behandelt werden, als seien sie zum Übertragen von Infektionen befähigt. Außerdem muss die Entsorgung unter Beachtung der korrekten Vorsichtsmaßnahmen erfolgen (14). Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Empfindliche Bereiche nach Kontakt mit den Reagenzien mit reichlich Wasser waschen.
5. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden, da dies falsche Ergebnisse hervorrufen könnte.
6. Verfahren der Gewebefixierung und Schnittdicken, die von den gemachten Angaben abweichen, können die Gewebemorphologie und/oder die Signalintensität beeinträchtigen.
7. Das Reagenz ist bereits optimal verdünnt. Eine weitergehende Verdünnung kann zu einem Leistungsverlust führen.
8. Um einen Kontakt mit Augen und Haut zu vermeiden, ist angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) zu tragen. Zusätzliche Informationen siehe das Sicherheitsdatenblatt.

9. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend den örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Lagerung – Brustkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) muss bei < –18 °C (–18 bis –25 °C wird empfohlen) an einem dunklen Ort gelagert werden. Aufgetaute Reagenzbehälter müssen immer in aufrechter Position aufbewahrt werden. Einfrieren und Auftauen der Reagenzien bis zu 10 Mal führt zu keiner Leistungsbeeinträchtigung. Diese Komponente nicht zu lange der Raumtemperatur aussetzen.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die Zusatzreagenzien ISH Pepsin (Dako Omnis) und Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) können durch Wärmeeinwirkung beeinträchtigt werden. Diese Kit-Komponenten dürfen nicht Raumtemperatur ausgesetzt werden.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und das Zusatzreagenz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) können durch starke Lichteinwirkung beeinträchtigt werden. Die Lagerung dieser Komponenten oder die Durchführung des Färbeverfahrens darf nicht unter intensiver Lichteinstrahlung, wie z.B. direktem Sonnenlicht, erfolgen.

Die Zusatzreagenzien ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) und Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) müssen an einem dunklen Ort bei 2-8 °C gelagert werden. ISH Pepsin (Dako Omnis) muss bei –18 bis 8 °C gelagert werden. Der Behälterdeckel bzw. Klappdeckel muss bei allen Reagenzien während der Lagerung geschlossen sein.

Verdünnte Lösungen (Arbeitslösungen von ISH Stringent Wash Buffer und ISH Pre-Treatment Solution) können bei 2-8 °C 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf dem Reagenzbehälter angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden. Während der Lagerung müssen die Deckel bzw. Klappdeckel der Behälter geschlossen sein. Werden die Reagenzien nicht unter den genannten Bedingungen aufbewahrt, muss die Reagenzleistung vom Anwender validiert werden (15).

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Folglich ist es wichtig, dass die im untersuchten Gewebeschnitt vorliegenden gesunden Zellen bewertet werden. Wenn ein unerwartetes Fluoreszenzmuster beobachtet und ein Problem mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) oder einem Zusatzreagenz vermutet wird, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Stabilität im Dako Omnis Gerät

Die Stabilitätsdauer von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die der Zusatzreagenzien ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) und ISH Pepsin (Dako Omnis) im Gerät beträgt 80 Stunden. Die Stabilität von verdünnter ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) und ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) im Gerät beträgt 7 Tage. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert. Bei Verwendung abgelaufener Reagenzien wird vom Dako Omnis Gerät eine Warnung ausgegeben; alle mit dem abgelaufenen Reagenz eingefärbten Objektträger ändern ihren Status auf "Suspicious" (Verdächtig), und das Objektträger-Protokoll auf der Arbeitsstation zeigt an, dass ein abgelaufenes Reagenz verwendet wurde.

Gewebevorbereitung – Brustkrebs

Die Handhabung von Biopsie-, Exzisions- oder Resektionsproben muss dergestalt erfolgen, dass die Gewebe für die FISH-Analyse erhalten bleiben. Für alle Proben sollten Standardmethoden der Gewebeverarbeitung für das immunzytochemische Anfärben genutzt werden (16).

Paraffineingebettete Schnitte

Für die Verwendung sind nur in neutralem, gepuffertem Formalin konservierte und paraffineingebettete Schnitte geeignet. Von Proben sollten beispielsweise Präparatblöcke mit

einer Dicke von 3 mm oder 4 mm angefertigt werden, gefolgt von 18-24 Stunden Fixierung in neutralem gepuffertem Formalin. Die Gewebe werden dann in einer abgestuften Ethanol- und Xylolreihe dehydriert und anschließend bei höchstens 60 °C mit geschmolzenem Paraffin infiltriert. Korrekt fixierte und eingebettete Gewebelöcke sind vor Anfertigung der Schnitte und deren Eindecken auf Objektträgern unbegrenzt haltbar, wenn sie an einem kühlen Ort (15-25 °C) aufbewahrt werden (16-17). Andere Fixative sind nicht geeignet.

Von den Gewebeproben werden Schnitte von 4-6 µm angefertigt.

Die für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation wie auch für die Verifikation des Vorliegens des Tumors benötigten Objektträger werden zur gleichen Zeit vorbereitet. Es wird empfohlen, mindestens zwei Serienschnitte von Gewebeproben anzufertigen: ein Schnitt wird zum Tumornachweis mit Hämatoxylin und Eosin (H- und E-Anfärbung) angefärbt und ein Schnitt dient für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation. Es wird empfohlen, die Gewebeschnitte auf Dako FLEX IHC Mikroskop-Objektträgern, Code-Nr. K8020, aufzuziehen. Superfrost Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific, J1800AMNZ) sind ebenfalls geeignet. Auf das Verfallsdatum der Glasobjektträger achten. Im Allgemeinen sollten Proben, die bei 2-25 °C aufbewahrt werden, innerhalb von < 6 Monaten nach dem Schneiden analysiert werden.

HINWEIS: Die Gewebeproben müssen sich auf dem Glas innerhalb des definierten Färbereichs des Objektträgers befinden. Abmessungen des Färbereichs des Objektträgers siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis.

GEBRAUCHSANWEISUNG – Brustkrebs

A. Vorbereitung der Reagenzien – Brustkrebs

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

Der Behälter mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) enthält ein goldbeschichtetes Metallkügelchen für das Mischen. Bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen werden kann, muss das Reagenz aufgetaut und gründlich gemischt werden, da beim Einfrieren eine Phasentrennung stattfindet.

Für das Mischen der Sonde dient das Mischgerät Dako Omnis Mixing Device.

Den unten aufgeführten Ablauf beim Mischen der Sonde mit dem Dako Omnis Mixing Device sowie für weitere Einzelheiten das Handbuch zum Mixing Device beachten.

1. Behälter mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) aus dem Tiefkühlschrank nehmen.
2. Den Behälter dann in das Dako Omnis Mixing Device laden.
3. Mixing Device anschließen und darauf achten, dass die grüne Statusleuchte leuchtet. Das Programm "Thaw + mix" (Auftauen und Mischen) auswählen. **Wichtig:** Behälter, die bei **weniger** als -25 °C gelagert wurden, sollten (erst kurz) vor dem Laden in das Dako Omnis Mixing Device aufgetaut und mit dem Programm "Mix" (Mischen) verarbeitet werden.
4. Behälter aus dem Mixing Device nehmen.
5. Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten (siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis für Einzelheiten).
6. Den Behälter dann umgehend in das Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis Geräts laden. Wenn während des Färbedurchlaufs die Funktion für kontinuierliches Reagenzladen angewendet wird, muss die Zeit zwischen Mischen und Aspiration des Behälters im Dako Omnis mindestens 10 Minuten betragen.

Die *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Sonde kann erneut aufgetaut und bis zu 10 Mal wiederverwendet werden.

Der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Sondenmix muss immer kurz vor dem Laden im Gerät gemischt werden. Nicht schütteln. Die Stabilität von ISH *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako

Omnis) im Gerät beträgt insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) muss nach der Phase im Innern des Dako Omnis umgehend an einen Ort mit $< -18\text{ °C}$ (-18 bis -25 °C wird empfohlen) umgelagert werden.

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) im Verhältnis von 1:20 wie folgt herstellen:

1. Eine Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche mit PTB-Zeichen (blaues Etikett) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Eine 175-mL-Flasche mit konzentrierter ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und die Spülflasche scannen).
5. Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei $2-8\text{ °C}$ 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens 18 °C erreichen, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübte verdünnte Lösung entsorgen.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen des konzentrierten ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) im Verhältnis von 1:20 wie folgt herstellen:

1. Eine Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche mit PTB-Zeichen (blaues Etikett) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Eine 175-mL-Flasche mit konzentriertem ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und danach die Spülflasche scannen).
5. Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei $2-8\text{ °C}$ 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens 18 °C erreichen, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübte verdünnte Lösung entsorgen.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Den Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen wird.

Die Stabilität von ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende

Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Nach dem Durchlauf kann die ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (2-8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

ISH Pepsin (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Zuerst auftauen und den Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen wird.

Die Stabilität von ISH Pepsin (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Nach dem Durchlauf muss ISH Pepsin (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (-18 bis 8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Eindeckmedium, das außerhalb des Dako Omnis Geräts verwendet wird. Nach der Anwendung das Fluoreszenz-Eindeckmedium umgehend auf Lagertemperatur (2-8 °C) bringen.

A.7 Weiteres Zubehör

Folgendes Zubehör muss zusätzlich in das Dako Omnis geladen werden: entionisiertes Wasser, verdünnter Wash Buffer 20x (Dako Omnis) Code-Nr. GC807, Clearify™ Code-Nr. GC810, ISH Cleaning Solution, Code GC207 sowie das ISH Lid (Dako Omnis) Code-Nr. GC102, wie in den Dako Omnis Handbüchern angegeben.

B. Färbeverfahren – Brustkrebs

B.1 Verfahrensanleitung

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist die Hybridisierungssonde für den automatisierten In-situ-Hybridisierungsassay unter direkter Fluoreszenz (FISH) im Dako Omnis Gerät und ist, zusammen mit den Zusatzreagenzien GM300, GM301, GM302, GM303 und GM304 (GM304 außerhalb des Geräts), vorgesehen für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation. Vor der Verwendung sind alle Anweisungen genau durchzulesen und der Benutzer muss sich mit allen Komponenten und Vorsichtsmaßnahmen vertraut machen.

Das automatisierte FISH-Färbeverfahren des Dako Omnis umfasst die Entparaffinierung von Gewebeschnitten, Demaskierung, Pepsinandaunung, Hybridisierung und stringentes Waschen. Die Objektträger werden in die trockene Entladestation entladen. Alle Protokollschritte sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert.

Die Dako Omnis Handbücher enthalten die Anweisungen zum Laden von Objektträgern, ISH Lid, Reagenzien usw. Es gibt drei validierte *HER2 IQFISH*-Protokolle, *HER2 IQFISH Pepsin Short* (kurzes Protokoll), *HER2 IQFISH Pepsin Medium* (mittleres Protokoll) und *HER2 IQFISH Pepsin Long* (langes Protokoll), die sich lediglich bezüglich der Pepsinandaunungszeit unterscheiden, in der Dako Omnis Software vorprogrammiert sind und für jeden der fünf Objektträger im Objektträgerhalter ausgewählt werden können. Dies ermöglicht eine optimale Gewebehandung, die von den Bedingungen vor der Analyse abhängen kann. Das Protokoll *HER2 IQFISH Pepsin Medium* (mittleres Protokoll) wird als Standardprotokoll betrachtet. Über die Dako Link Omnis Workstation können die verschiedenen Färbeprotokolle aufgerufen werden.

B.2. Vor dem Färbeverfahren

1. In der Dako Link Omnis Workstation-Software unter den IQFISH-Protokollen das *HER2 IQFISH*-Protokoll für jeden Objektträger auswählen.
2. Etiketten für jeden Träger ausdrucken und auf den Glasobjektträgern befestigen.
3. Die Objektträger dann in den Objektträgerhalter setzen. Detaillierte Anweisungen siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis. Der Objektträgerhalter ist groß genug für

einen bis fünf Objektträger. Es ist ratsam, mindestens zwei Objektträger in einem *HER2* IQFISH-Färbedurchlauf zu färben.

4. Den Objektträgerhalter in das Dako Omnis laden.
5. Das ISH Lid (ein ISH Lid pro Objektträgerhalter) in das Dako Omnis laden.
6. Es müssen sich Spülflaschen mit Flüssigkeit im Gerät befinden, die durch das Dako Omnis Gerät registriert wurden. Flüssigkeiten für Spülflaschen: Clearify™ (Intermedium), verdünnte ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), verdünnter ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) und verdünnter Wash Buffer (Dako Omnis).
7. Die ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) und das ISH Pepsin (Dako Omnis) sowie die frisch gemischten *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die ISH Cleaning Solution in das Reagenzienvorratsmodul laden. Alle Klappdeckel müssen offen sein.
8. Die Anweisungen auf dem Touchscreen befolgen und auf "Done" tippen, damit das Färbeverfahren gestartet wird.

B.3. Färbeverfahren

Das *HER2* IQFISH-Färbeverfahren mit dem Dako Omnis Gerät (siehe Tabelle 1 für einen Überblick) kann auf der Dako Link Omnis Workstation überwacht werden:

Tabelle 1. Vereinfachter Überblick über die Protokollschritte für das *HER2* IQFISH-Färbeverfahren.

Schritt	Reagenz	Zeit und Temperatur
Wachs Entfernung	Clearify™ (Intermedium)	10 Minuten, 38 °C
Demaskierung	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 Minuten, 97 °C
Waschung	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2x 3 Minuten, 32 °C
Andauung *	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10, 15 oder 20 Minuten
Trocknung		15 Minuten, 45 °C
Denaturierung		10 Minuten, 66 °C
Hybridisierung	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)	75 Minuten, 45 °C
Stringente Waschung	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 Minuten, 61 °C

* Es kann über die oben erwähnten *HER2* IQFISH-Protokolle aus drei validierten Pepsinandaungszeiten ausgewählt werden.

Wenn keine weiteren ISH-Färbungen anstehen, müssen alle Reagenzien im empfohlenen Temperaturbereich aufbewahrt werden.

B.4. Nach dem Färbeverfahren

Die Objektträger entladen und bis zu 30 µL Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) mit DAPI auf den Zielbereich des Objektträgers applizieren. Der Gewebeschnitt muss vollständig von Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) bedeckt sein. Ein Deckglas darüber legen.

HINWEIS: Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger kann nach 15 Minuten oder innerhalb von 7 Tagen nach dem Eindecken erfolgen. Es kommt allerdings zu Verblässen, falls die Objektträger Licht oder hohen Temperaturen ausgesetzt werden. Um ein Verblässen so gering wie möglich zu halten, sind die Objektträger bei –18 bis 8 °C im Dunkeln aufzubewahren.

Qualitätskontrolle – Brustkrebs

1. Signale müssen hell, distinkt und leicht zu bewerten sein.
2. Normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle für den Färbedurchlauf.

- Normale Zellen sollten ein bis zwei deutlich sichtbare grüne Signale geben und darauf hinweisen, dass die CEN-17 PNA-Sonde eine erfolgreiche Anlagerung an die Centromer-Region von Chromosom 17 erreicht hat.
 - Normale Zellen sollten außerdem ein bis zwei deutlich sichtbare rote Signale erbringen und darauf hinweisen, dass eine erfolgreiche Anlagerung der *HER2*-DNA-Sonde an das *HER2*-Gen stattfand.
 - Bedingt durch das Mikrotomieren werden einige normale Zellen weniger als die für jede Farbe erwarteten zwei Signale erbringen.
 - Werden bei gesunden Zellen keine Signale nachgewiesen, verweist dies auf Assay-Versagen, und die Ergebnisse müssen als ungültig angesehen werden.
3. Bei der Bewertung mit einem DAPI-Filter muss die nukleare Morphologie intakt sein. Zahlreiche schemenhafte Schattenzellen und eine generell schlechte nukleare Morphologie verweisen auf übermäßige Andauung der Probe, die in Signalverlust oder -fragmentierung resultiert. Solche Proben müssen als ungültig angesehen werden.
 4. Mindestens 20 Tumorzellen müssen auswertbar sein.
 5. Unterschiede bei der Gewebefixierung und -einbettung im Labor des Anwenders können Variationen der Resultate hervorrufen und eine regelmäßige Evaluation der laborinternen Kontrollen erforderlich machen.

Interpretation des Anfärbens – Brustkrebs

Auswertbares Gewebe

Eine Untersuchung ist nur bei Proben von Patientinnen mit invasivem Karzinom vorzunehmen. Sind in einer Probe sowohl Karzinome in situ als auch invasive Karzinome vorhanden, so ist nur die invasive Komponente zu bewerten. Nekrotische Bereiche sind ebenso wie Bereiche mit nicht eindeutigen nuklearen Rändern auszuklammern. Es dürfen keine Zellkerne einbezogen werden, bei denen ein subjektives Urteil gefällt werden muss. Zellkerne mit schwacher Signalintensität und unspezifischer Hintergrundfärbung sind zu übergehen.



Auszählung

Den Tumor innerhalb des Kontextes des mit dem H- und E-Verfahren angefärbten Objektträgers lokalisieren und den gleichen Bereich auf dem mit dem FISH-Verfahren verarbeiteten Objektträger bewerten. Mehrere Tumorzellbereiche untersuchen, um mögliche Heterogenität zu berücksichtigen. Einen Bereich auswählen, der durch gute Verteilung der Zellkerne gekennzeichnet ist. Mit der Analyse am linken oberen Quadranten des ausgewählten Bereichs beginnen. Die mikroskopische Untersuchung von links nach rechts vornehmen und die Anzahl der Signale innerhalb des nuklearen Saums jedes bewerteten Zellkerns nach den unten angeführten Leitlinien auszählen (siehe auch Anhang 2).

- Auf- und abwärts fokussieren, um alle Signale im jeweiligen Zellkern ausfindig zu machen.
- Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
- Bei Zellkernen mit hohen Niveaus der *HER2*-Genamplifikation können die *HER2*-Signale sehr nahe aneinander liegen und einen Signal-Cluster bilden. In diesen Fällen kann die Anzahl der *HER2*-Signale nicht ausgezählt werden und es muss eine Schätzung erfolgen. Besondere Aufmerksamkeit muss den grünen Signalen gewidmet werden, da Cluster von *HER2*-Signalen die grünen Signale verdecken können, sodass sie nicht sichtbar sind. Im Zweifelsfall sind die grünen Signale mithilfe eines spezifischen FITC-Filters zu kontrollieren.

Zellkerne ohne Signale oder mit nur eine Farbe aufweisenden Signalen dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden. Nur solche Zellkerne bewerten, die ein oder mehrere FISH-Signale jeder Farbe zeigen.

Leitfaden für die Signalzählung

1		Nicht in die Zählung aufnehmen. Zellkerne überlappen einander, nicht alle Bereiche der Zellkerne sichtbar.
2		Zwei grüne Signale; Zellkerne mit nur einer Signalfarbe dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden.
3		Als 3 grüne und 12 rote Signale zählen (Cluster-Schätzung).
4		Als 1 grünes und 1 rotes Signal zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
5		Nicht in die Zählung aufnehmen (übermäßige oder zu geringe Andauung der Zellkerne). Fehlende Signale in der Mitte der Zellkerne (ringförmige Zellkerne).
6		Als 2 grüne und 3 rote Signale zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
7		Als 1 grünes und 5 rote Signale zählen.
8		Als 3 grüne (1 grünes Signal mit verschwommenem Fokus) und 3 rote Signale zählen.
9		Cluster roter Signale kaschieren grüne Signale. Grüne Signale mit einem spezifischen FITC-Filter überprüfen oder nicht in die Zählung aufnehmen.

Zählungen wie in Anhang 1 verdeutlicht in einer Tabelle aufzeichnen.

Pro Gewebeprobe werden 20 Zellkerne ausgezählt und zwar wo möglich von deutlich erkennbaren Tumorbereichen (18).

Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis wie folgt berechnen: Dividieren der Gesamtzahl roter *HER2*-Signale durch die Gesamtzahl grüner *CEN-17*-Signale.

Für Proben mit einem *HER2/CEN-17*-Verhältnis über oder gleich 2 ist die Amplifikation des *HER2*-Gens anzunehmen (3, 18-20).

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Wertes (1,8-2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Liegt das Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8-2,2), sind 20 weitere Zellkerne auszuzählen und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen neu berechnet.

Im Zweifelsfall ist eine erneute Bewertung des Objektträgers vorzunehmen. Bei Fällen im Borderline-Bereich sollte eine Konsultation zwischen dem Pathologen und dem behandelnden Arzt stattfinden.

Beschränkungen – Brustkrebs

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Dako Omnis Geräten.
2. Spezielle Schulung ist erforderlich für die Gewebe-Auswahl, Fixierung, Objektträger-vorbereitung und für die Auswertung der IQFISH-Färbung. Die Interpretation der Färbung mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) darf nicht durch Personen mit Farbsehstörungen erfolgen.
3. Mit dem FISH-Verfahren erhaltene Resultate sind von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färbeschritt abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, falsches Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten können die Sondenhybridisierung beeinflussen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.
4. Das Leistungsvermögen des *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assays wurde nicht für Brustkrebsproben mit Mikrokalzifikation validiert.

Leistungseigenschaften – Brustkrebs

Hybridisierungseffizienz

Die Hybridisierungseffizienz von *HER2* IQFISH pharmDx™ wurde unter Anwendung von 180 formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten untersucht, die in drei verschiedenen Studienzentren getestet wurden. Alle 180 Gewebeschnitte konnten in Übereinstimmung mit den Produktausverzeichnisse Richtlinien benannt werden. Die Hybridisierungseffizienz betrug 100%.

Die berechneten und in den Studien zu den Leistungseigenschaften verwendeten *HER2/CEN-17*-Verhältnisse basieren auf der Auszählung von Signalen aus 20 Zellkernen unter Verwendung der Bewertungsrichtlinien im Abschnitt Interpretation des Anfärbens in dieser Gebrauchsanweisung.

Analytische Empfindlichkeit

Bei der Untersuchung der analytischen Empfindlichkeit von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurden 20 verschiedene Brustkrebsgewebeproben (zehn Proben mit Amplifikation des *HER2*-Gens und zehn ohne Amplifikation) verwendet. Auf der Grundlage des Auszählens von Signalen aus 20 Zellkernen von normalen Zellen der Gewebeprobe wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl von *HER2*-Signalen und CEN-17-Signalen berechnet. Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis für die in den 20 Brustkrebsgewebeproben identifizierten normalen Zellen betrug 0,97-1,11.

Analytische Spezifität

Zur Bestätigung einer Gesamtabdeckung von 218 kb einschließlich des *HER2* -Gens wurden die *HER2* DNA-Sonden im *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) der Endsequenzierung und Kartierung unterzogen.

Die CEN-17-PNA-Sonden im *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurden einzeln und in Kombination miteinander durch FISH getestet, um ihre spezifische Hybridisierung der Centromer-Region von Chromosom 17 zu bestätigen.

Um eine Kreuz-Anlagerung an andere Chromosomen als an Chromosom 17 auszuschließen, wurden nach Maßgabe der von Dako genutzten Verfahren der Qualitätskontrolle Studien an Metaphasen-Spreads durchgeführt. Insgesamt 275 Metaphasen-Ausdehnungen mit deutlichen Signalen wurden auf die spezifische Hybridisierung der *HER2*-DNA und des CEN-17 PNA Probe Mixes bewertet. In allen 275 Fällen war die Hybridisierung spezifisch für Chromosom 17. In keinem der 275 Fälle

wurde Cross-Hybridisierung mit Loci anderer Chromosomen beobachtet. Die SONDENSPEZIFITÄT betrug also 100% (275 von 275).

Um die Eigenschaft des IQFISH Assay zu bestimmen, allein die Zielsubstanzen *HER2* und CEN-17 ohne Interferenz mit anderen Substanzen zu identifizieren, wurden Gewebeprobe von Mammakarzinomen unter Weglassen der *HER2*- und CEN-17 Sonden aus dem Hybridisierungsmix mit dem Hybridisierungspuffer alleine untersucht. Insgesamt 20 Proben wurden auf das Vorliegen von Signalen hin bewertet, die nicht auf den Sondenmix zurückzuführen waren. In keiner der 20 Proben wurden Zielregionen anderer Chromosomen oder Interferenzen mit nahe verwandten Substanzen detektiert.

Studien zur Robustheit

Testung der Robustheit des *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assays erfolgte anhand von unterschiedlichen PNA-Sondenkonzentrationen, Demarkierungszeiten, Pepsin-Inkubationszeiten, Denaturierungszeiten, Hybridisierungszeiten sowie Zeiten und Temperaturen des Waschschriffs mit adstringierendem Puffer. Die unterschiedlichen Parameter wurden an fünf FFPE-Brustkrebsgewebeprobe getestet (es wurden amplifizierte und nicht amplifizierte Gewebeprobe verwendet).

Alle Parameter wurden sowohl unterhalb als auch oberhalb der Standardprotokolleinstellungen getestet, ausgenommen die PNA-Sondenkonzentration und Temperatur des Waschschriffs mit adstringierendem Puffer. Für diese wurde die Standardprotokolleinstellung bei der Einrichtung berücksichtigt.

Die Testparameter waren:

PNA-Sondenkonzentration: Getestet bei 100% und +/-17%.

Demarkierungszeit: Getestet bei 13 min 45 s und 16 min 15 s.

Pepsin-Inkubationszeit: Getestet bei 14 min 45 s und 16 min 15 s.

Denaturierungszeit: Getestet bei 9 min 45 s und 10 min 45 s.

Hybridisierungszeit: Getestet bei 70 min und 80 min.

Waschzeit mit adstringierendem Puffer: Getestet bei 8 min 45 s und 11 min 15 s.

Waschtemp. mit adstringierendem Puffer.: Getestet bei 59 °C, 61 °C und 63 °C.

Die drei PNA-Sondenkonzentrationen wurden, wie in Tabelle 2 gezeigt, in einem fraktionierten Design of Experiment (JMP-Tool, SAS) ausgewertet, das mit 12 verschiedenen Färbeprotokollen durchgeführt wurde.

Tabelle 2. Zwölf verschiedene in der Studie zur Robustheit verwendete Färbeprotokolle.

Robustheit Protokoll Nr.	Testparameter						
	Demarkierungszeit (min)	Pepsin- Zeit (min)	Denaturierungszeit (min)	Hybridisierungszeit (min)	Waschzeit m. adstr. Puffer (min)	Waschtemp. m. adstr. Puffer (°C)	PNA- Konz. im Sonden- mix
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Alle fünf Gewebeproben wurden jeweils nach allen 12 Protokollen gefärbt.

Die Sichtanzeigen der Studie zur Robustheit waren Signalintensität und morphologische Qualität. Jedes Protokoll führte zu Färbereaktionen in allen Gewebeproben (60 insgesamt) mit hellen, deutlichen sowie leicht zu bewertenden und damit für die Signalauszahlung geeigneten Signalen.

Außerdem wurde die Auswirkung der Gewebedicke auf die Ergebnisse des *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assay mit unterschiedlichen Schnittdicken der FFPE-Brustkrebsgewebeproben getestet.

Insgesamt wurden fünf konsekutive Schnitte aus fünf humanen Brustkrebsproben unterschiedlicher Dicke (3, 4, 5, 6, und 7 µm) mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) getestet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses betrug 5,8% (zwischen 4,3 und 7,1%).

Reproduzierbarkeit

Die Tag-zu-Tag und Charge-zu-Charge-Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors wurde mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) getestet. Die Studie wurde als interne, verblindete, randomisierte Studie des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses ausgelegt. Es wurden Schnitte von acht verschiedenen formalinfixierten paraffineingebetteten Brustkrebsproben mit unterschiedlichen Anteilen an *HER2*-Genamplifikationen verwendet. Diese acht Proben wurden mit dem HercepTest™ getestet und enthielten zwei Proben mit Status *HER2* IHC 0/1+, zwei Proben mit Status *HER2* IHC 2+, zwei Proben mit Status *HER2* IHC 3+ und zwei Proben mit einem vorbestimmten *HER2/CEN-17* FISH-Verhältnis zwischen 1,5 und 2,5, das mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) erzielt wurde. Jede Probe wurde mit drei verschiedenen Chargen *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) an fünf nicht konsekutiven Tagen gefärbt. Für die gesamte Studie wurden insgesamt 240 Gewebeanfärbungen verarbeitet, da jede Kombination doppelt gefärbt wurde. Variationen des Verhältnisses zwischen Tagen und Chargen werden in Abbildung 1 gezeigt. Die Daten wurden mithilfe einer Box-Cox-Transformation über ein Random-Effect-Modell analysiert, um Varianzhomogenität für die Daten zu erreichen. Der Gesamt-Variationskoeffizient wurde auf 4,3% geschätzt und es wurde festgestellt, dass Tages- und Chargenvariation mit 1,5 bzw. 0% dazu beitrugen.

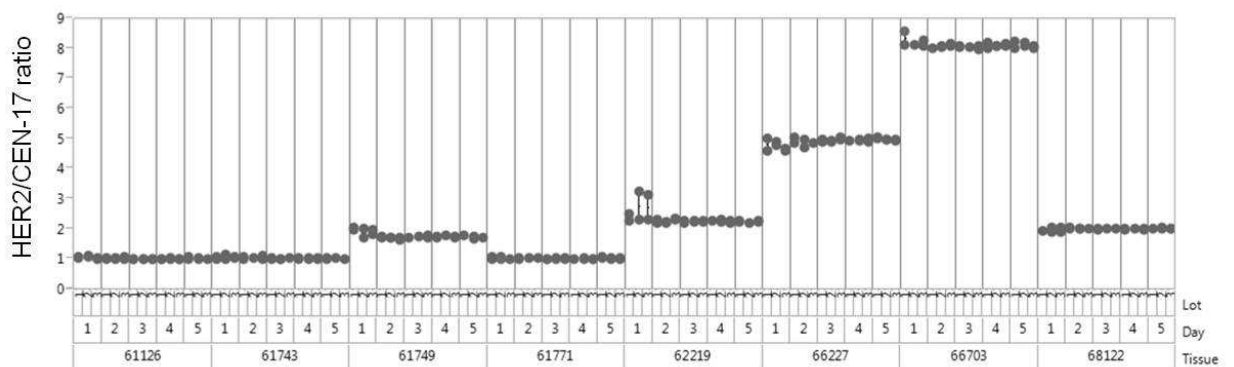


Abb. 1. *HER2/CEN-17*-Verhältnisse aus einer Studie zur Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors für *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), einschließlich der Endpunkte Charge-zu-Charge- und Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit.

Zusätzlich wurden die Tag-zu-Tag- und Studienort-zu-Studienort-Reproduzierbarkeit für *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) extern in einer stratifizierten und verblindeten Studie an drei Studienorten (einer in den USA und zwei in Europa) an Gewebeschnitten von 12 verschiedenen formalinfixierten paraffineingebetteten Brustkrebsproben getestet. Drei Proben hatten den Status *HER2* IHC 0/1+, drei *HER2* IHC 2+, drei *HER2* IHC 3+ und drei Proben wiesen ein vorbestimmtes *HER2/CEN-17* FISH-Verhältnis zwischen 1,5 und 2,5, das jeweils mit dem HercepTest™ und *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) erzielt wurde. Die Proben wurden in den Studienzentren gefärbt und analysiert. Jede Gewebeprobe wurde mindestens fünf Mal an fünf nicht konsekutiven Tagen gefärbt und von einem Untersucher an jedem Studienort ausgewertet. 192 Schnitte wurden gefärbt und in der statistischen Analyse berücksichtigt. Die Daten wurden mit einer Box-Cox-Transformation analysiert und die Varianzkomponenten wurden berechnet. Der Gesamt-Variationskoeffizient auf Basis der oberen 95%-Konfidenzgrenze betrug 15%. Die Varianz des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses nach Tag und Studienort wird in Abbildung 2 gezeigt.

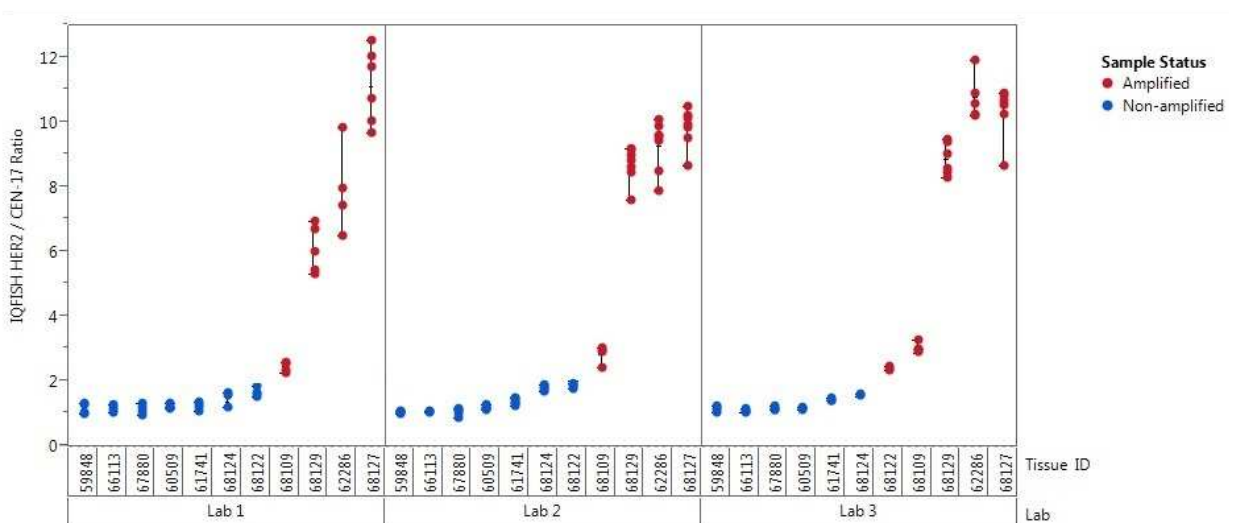


Abb. 2. Variationsdiagramm der *HER2/CEN-17*-Verhältnisse in nicht transformierten Einheiten aus der Studie zu Tag-zu-Tag- und Studienort-zu-Studienort-Reproduzierbarkeit für *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) an Brustkrebsgewebeproben.

Der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assay wurde als Teil der intern durchgeführten Methodenvergleichsstudie mit drei Untersuchern, die die gefärbten

Proben unabhängig voneinander ausgewertet, auf Untersucher-zu-Untersucher-Reproduzierbarkeit getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde an 140 verschiedenen humanen Brustkrebsproben entweder mit amplifiziertem oder nicht amplifiziertem *HER2*-Gen getestet. Die Daten wurden mit der Box-Cox-Transformation analysiert. Der durchschnittliche Variationskoeffizient zwischen den Untersuchern lag bei 9%.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) innerhalb des Labors wurde mit konsekutiven Schnitten von acht humanen Brustkrebsproben mit entweder amplifiziertem oder nicht amplifiziertem *HER2*-Gen getestet. Die Gewebe wurden an fünf nicht konsekutiven Tagen mit drei verschiedenen Chargen an insgesamt 240 Objektträgern (120 Schnitte mit Duplikat) doppelt getestet. Aus der Datenanalyse mit dem Random-Effects-Modell ergaben sich Unterschiede, die auf Tage und Chargen zurückzuführen waren (wie in der internen Studie zur Reproduzierbarkeit gezeigt). Die übrigen Unterschiede entsprechen der Varianz zwischen Wiederholungen und damit der Wiederholbarkeit. Die obere 95%-Konfidenzgrenze für den Variationskoeffizient der Reproduzierbarkeit betrug 4,4%.

Methoden-Vergleichsstudien

Vergleich der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Ergebnisse mit den *HER2* IQFISH pharmDx™ Ergebnissen

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurde mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) in einer Vergleichsstudie an 140 humanen Brustkrebsgewebeprobe verglichen. Die Proben umfassten 77 Fälle mit nicht amplifiziertem *HER2* und 63 Fälle mit amplifiziertem *HER2* mit bekanntem HercepTest™-Score wie in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3. Verteilung der Proben auf Basis des HercepTest™-Scores und des *HER2* FISH-Scores (*HER2*-Genstatus), die mit dem *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) erzielt wurden.

HercepTest™ Intensitäts-Score	0	1+	2+	3+	Gesamt
n	27	11	53	49	140
<i>HER2</i> FISH Status					
Amplifiziert	2	0	13	48	63
Nicht amplifiziert	25	11	40	1	77
Gesamtzahl FISH-getestete Proben	27	11	53	49	140

Die Ergebnisse der Kreuztabulierung des *HER2*-Genstatus aus den zwei Assays mit Berechnung der prozentualen Gesamtübereinstimmung (overall percent agreement, OPA), der prozentualen Positivübereinstimmung (positive percent agreement, PPA) und der prozentualen Negativübereinstimmung (negative percent agreement, NPA) werden in Tabelle 4 gezeigt. Die Korrelation zwischen den *HER2*/CEN-17-Verhältnissen anhand der zwei Assays wird in Abbildung 3 gezeigt.

Tabelle 4. Kreuztabulierung des *HER2*-Genstatus, der mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) und *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) bestimmt wurde.

		<i>HER2</i> -Genstatus (K5731)		Gesamt
		Nicht amplifiziert	Amplifiziert	
<i>HER2</i> -Genstatus (Dako Omnis)	Nicht amplifiziert	77	0	77
	Amplifiziert	0	63	63
Gesamt		77	63	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				

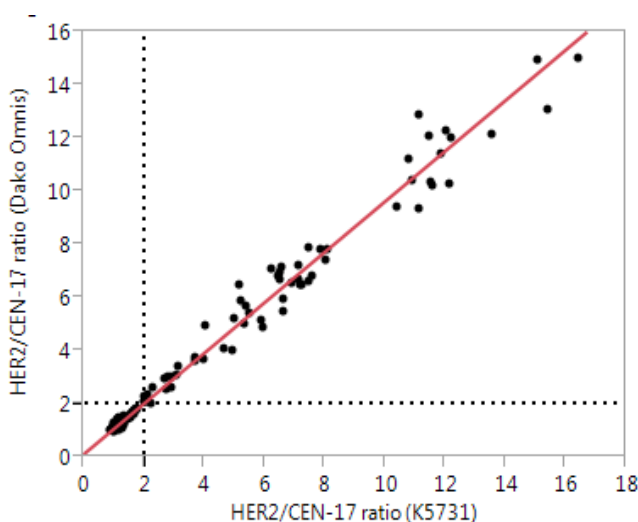


Abb. 3. Korrelation zwischen den *HER2*/CEN-17-Verhältnissen aus *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) aus 140 Brustkrebsproben (linearer Ausgleich: $y = 0,11 + 0,95 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. Gewichtet mit der Umkehrvarianz, um einen linearen Ausgleich zu ermöglichen).

Die *HER2*/CEN-17-Verhältnisse wurden für die Analyse log-transformiert. Das 95%-Konfidenzintervall für die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Färbemethoden bei *HER2*/CEN-17-Verhältnis = 2 ergab [0,002; 0,031]. Das bedeutet, eine Differenz von über 3% wird mit 95% Konfidenz nicht erwartet.

Der mittlere quadratische Gesamtfehler (Root Mean Square Error, RMSE) lag bei 9%. Er zeigt den durchschnittlichen Schwankungsumfang um den Durchschnittswert an.

Vergleich der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Ergebnisse mit den Ergebnissen aus dem PathVysion*HER-2* DNA Probe Kit

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurde mit dem PathVysion *HER-2* DNA Probe Kit in einer Vergleichsstudie an 140 humanen Brustkrebsgewebeproben verglichen. Die Proben umfassten 80 Fälle mit nicht amplifiziertem *HER2* und 60 Fälle mit amplifiziertem *HER2* mit bekanntem HercepTest™-Score wie in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5. Verteilung der Proben auf Basis des HercepTest™-Scores und des HER2 FISH-Scores (HER2-Genstatus), die mit dem HER2 IQFISH pharmDx™ (Code K5731) erzielt wurden.

HercepTest™ Intensitäts-Score	0	1+	2+	3+	Gesamt
n	28	10	54	48	140
HER2 FISH Status					
Amplifiziert	1	0	12	47	60
Nicht amplifiziert	27	10	42	1	80
Gesamtzahl FISH-getestete Proben	28	10	54	48	140

Die Ergebnisse der Kreuztabulierung des HER2-Genstatus aus den zwei Assays mit Berechnung der prozentualen Gesamtübereinstimmung (overall percent agreement, OPA), der prozentualen Positivübereinstimmung (positive percent agreement, PPA) und der prozentualen Negativübereinstimmung (negative percent agreement, NPA) werden in Tabelle 6 gezeigt. Die Korrelation zwischen den HER2/CEN-17-Verhältnissen anhand der zwei Assays wird in Abbildung 4 gezeigt.

Tabelle 6. Kreuztabulierung des HER2-Genstatus, der mit dem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit und HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) bestimmt wurde.

		HER2-Genstatus (PathVysion)		Gesamt
		Nicht amplifiziert	Amplifiziert	
HER2-Genstatus (Dako Omnis)	Nicht amplifiziert	80	0	80
	Amplifiziert	0	60	60
Gesamt		80	60	140
OPA: 100%				
PPA: 100%				
NPA: 100%				

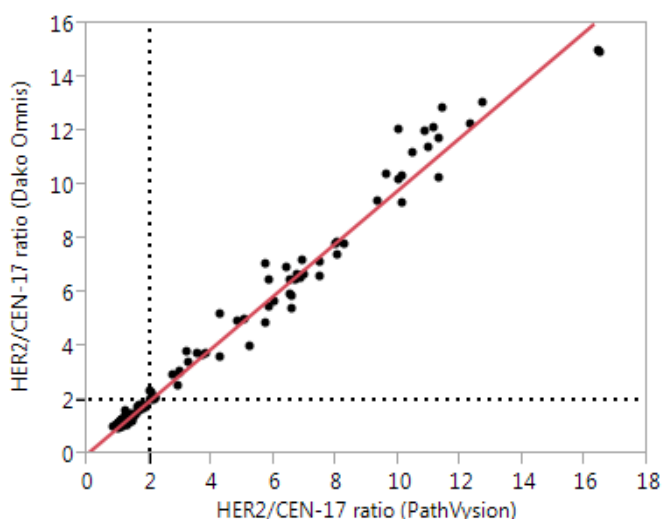


Abb. 4. Korrelation zwischen den HER2/CEN-17-Verhältnissen aus HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und PathVysion aus 140 Brustkrebsproben (linearer Ausgleich: $y = 0,01 + 0,95x$; $R^2 = 0,96$. Gewichtet mit der Umkehrvarianz, um einen linearen Ausgleich zu ermöglichen).

Die HER2/CEN-17-Verhältnisse wurden für die Analyse log-transformiert. Das 95%-Konfidenzintervall für die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Färbemethoden bei HER2/CEN-17-Verhältnis = 2 ergab [0,001; 0,031]. Das bedeutet, eine Differenz von über 3% wird mit 95% Konfidenz nicht erwartet.

Der mittlere quadratische Gesamtfehler (Root Mean Square Error, RMSE) lag bei 10%. Er zeigt den durchschnittlichen Schwankungsumfang um den Durchschnittswert an.

Klinischer Nutzen bei der Selektion von Patientinnen für die Herceptin™ (Trastuzumab) Behandlung

Das *HER2* FISH pharmDx™ Kit wurde in Vergleichsstudien gegenüber dem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit und dem Dako HercepTest™ untersucht. Es sind für insgesamt 940 Brustkrebsproben *HER2* FISH Testergebnisse verfügbar.

Vergleich der *HER2* FISH pharmDx™ (Dako Omnis) Ergebnisse mit den Ergebnissen des PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Es wurden drei Studien durchgeführt, die die Ergebnisse des *HER2* FISH pharmDx™ Kit-Tests mit den Ergebnissen des PathVysion HER-2 DNA Probe Kit-Tests vergleichen (siehe Tabelle 7). Die Studien wurden an geographisch getrennten Orten durchgeführt und es gab keine Überlappungen bei den verwendeten Proben. Es wurden insgesamt 328 Proben getestet.

Tabelle 7. Zusammenfassung: Daten der Vergleichsstudien zur FISH-Methode.

Studienbezeichnung	Konkordanzstudie (dänische Proben, N = 190)	Konkordanzstudie (japanische Proben, N = 52)	Konkordanzstudie (französische Proben, N = 86) (21)*
Konkordanz (95%- Konfidenzintervall)	93,68% (90,22-97,14%)	96,15%	
Prozentuale Positivübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall)	86% (77,34-95,08%)	97%	
Prozentuale Negativübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall)	97% (94,05-99,89%)	96%	

* Im Artikel wurden Vergleichsdaten zur Verfügung gestellt, aber der *HER2* FISH Assay wurde nicht identifiziert.

Es gab insgesamt 12 diskrepante Testergebnisse zwischen dem *HER2* FISH pharmDx™ Kit-Test und dem PathVysion™ HER-2 DNA Probe-Test für die dänischen klinischen Proben (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8. Zusammenfassung der Daten für die 12 diskrepanten Testergebnisse.

HER2 FISH(positiv)/PathVysion(negativ)				HER2 FISH(negativ)/PathVysion(positiv)			
ID-Nr.	HER2 FISH Verhältnis	PathVysion Verhältnis	HercepTest Score	ID-Nr.	HER2 FISH Verhältnis	PathVysion Verhältnis	HercepTest Score
160	2,10* (1,82-2,51)	1,51 (1,39-1,68)	2+	234	1,68 (1,38-1,83)	2,02* (1,84-2,29)	2+
208	3,61 (2,95-4,73)	1,62 (1,51-1,82)	2+	284	1,44 (1,07-1,83)	2,21* (1,94-2,64)	2+
306	2,20* (1,79-2,24)	1,33 (1,18-1,44)	1+	423	1,7 (1,52-1,95)	2,15 (2,02-2,45)	1+
846	2,58 (2,06-3,50)	1,51 (1,42-1,76)	2+	474	1,44 (1,16-1,83)	2,55 (2,38-3,26)	2+
				735	1,68 (1,40-1,99)	2,03* (1,89-2,19)	2+
				746	1,05 (0,96-1,18)	4,53 (4,27-5,17)	3+
				837	1,52 (1,48-1,79)	2,15 (2,10-2,67)	3+
				881	1,83* (1,15-1,69)	2,68 (2,39-3,14)	2+

* KI der durchschnittlichen Log-Ratios enthielt 2,0. Zahlen in Klammern sind das 95%-KI

In der Diskrepanzanalyse wurden log-Ratios verwendet. Das 95%-Konfidenzintervall wurde für die 60 log-Ratios der Zellkerne berechnet, die für die Berechnung des PathVysion HER-2 DNA Probe Verhältnisses verwendet wurden. Von den vier Fällen, in denen das Ergebnis des *HER2* FISH pharmDx™ Kits positiv und das der PathVysion HER-2 DNA Probe negativ war enthielt kein Intervall den kritischen Wert 2. Von den acht Fällen, in denen das Ergebnis des *HER2* FISH pharmDx™ Kits negativ und das der PathVysion HER-2 DNA Probe positiv war enthielt das 95%-KI von dreien (Nr. 234, 284 und 735) den kritischen Wert 2. Das 95%-Konfidenzintervall wurde in ähnlicher Weise für die log-Ratios der Zellkerne berechnet, die für die Berechnung der Ratio des *HER2* FISH pharm Dx™ Kits verwendet wurden. Von den vier Fällen, in denen das Ergebnis des *HER2* FISH pharmDx™ Kits positiv und das der PathVysion HER-2 DNA Probe negativ war enthielten zwei den kritischen Wert 2 (Nr. 160 und 306). Von den acht Fällen, in denen das Ergebnis des *HER2* FISH pharmDx™ Kits negativ und das der PathVysion HER-2 DNA Probe positiv war enthielt das 95%-KI eines Falls (Nr. 881) den kritischen Wert 2.

Vergleich der Ergebnisse des *HER2* FISH pharmDx™ Kits mit den Ergebnissen des HercepTest™

Es wurden vier Studien durchgeführt, die die Ergebnisse des *HER2* FISH pharmDx™ Kits mit denen des HercepTest™ vergleichen. Es wurden insgesamt 940 Proben verglichen, wobei ein Intensitäts-Score von 3+ als ein positives IHC-Ergebnis im HercepTest™ Assay verwendet wurde (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9. Zusammenfassung der Vergleichsstudien zum *HER2* FISH pharmDx™ Kit und IHC (HercepTest™).

Studienbezeichnung	Dänische klinische Proben (N = 682)	Japanische Proben (N = 52)	Französische Studie (N = 86) (31)	Dänische Pilot-Studie (N = 120) (22)
Konkordanz (95%-Konfidenzintervall)	93,11% (91,25-95,01%)	96,15%	87,21%	93,33%
Prozentuale Positivübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall)	91% (87,39-94,57%)	96%	87%	84%
Prozentuale Negativübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall)	94% (92,12-96,46%)	96%	87%	97%

Daten zur Verteilung der Ergebnisse des HercepTest™ und von *HER2* FISH für die dänischen klinischen Proben werden in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10. Verteilung des *HER2*-Status nach HercepTest™ und *HER2* FISH pharmDx™ Kit.

HercepTest™ Intensitäts-Score	0	1+	2+	3+	Gesamt
n	221	267	84	248	820
%	27	33	10	30	100%
<i>HER2</i> FISH Status					
Amplifiziert	0	8	17	222	247
Nicht amplifiziert	106	245	62	22	435
Gesamtzahl FISH-getestete Proben	106	253	79	244	682

Fehlerbehandlung – Brustkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
1. Keine Signale oder schwache Signale	<p>1a. Reagenzien wurden während Transport oder Lagerung hohen Temperaturen ausgesetzt.</p> <p>1b. Funktionsstörung des Mikroskops</p> <ul style="list-style-type: none"> - Unangemessener Filtersatz - Falsche Lampe - Quecksilberdampf Lampe zu alt - Verschmutzte und/oder gesprungene Sammellinsen - Ungeeignetes Immersionsöl <p>1c. Abgeschwächte Signale</p> <p>1d. Puffer werden falsch erkannt</p>	<p>1a. Lagerungsbedingungen überprüfen. Bei Entgegennahme der IQISH-Sondenmix- und Pepsinlieferungen muss Trockeneis vorhanden gewesen sein. Überprüfen, ob die Reagenzien gemäß Angaben aufbewahrt wurden.</p> <p>1b. Mikroskop überprüfen und gewährleisten, dass die genutzten Filter für Sondenmix-Fluorochrome geeignet sind und dass die Quecksilberdampf Lampe angemessen ist und ihre Nutzungszeit nicht überschritten wurde (siehe Anhang 2). Im Zweifelsfall Kontakt mit dem Mikroskop-Lieferanten aufnehmen.</p> <p>1c. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und starken Lichteinfall auf einem Minimum halten.</p> <p>1d. Waschpuffer austauschen und korrekte Registrierung (auf der Workstation) und Erkennung der Waschpuffer (auf dem Touchscreen) überprüfen. Weitere Einzelheiten siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis. Hinweis: ISH Pre-Treatment Solution ist grün und ISH Stringent Wash Buffer ist gelb.</p>
2. Bereiche ohne Signal	2. Lufteinschlüsse während des Eindeckens	2. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Falls doch Luftblasen auftreten, vorsichtig mit einer Pinzette abklopfen.
3. Übermäßige Hintergrundanfärbung	3a. Falsche Gewebefixierung	3a Nur formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte verwenden.

Brustkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	3b. Hybridisierter Schnitt war zu lange hellem Licht ausgesetzt.	3b. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung zu starkem Licht auf einem Minimum halten.
4. Schlechte Gewebemorphologie	4a. Falsche Pepsin-Behandlung	4a. Zu einem anderen der drei unterschiedlichen Färbeprotokolle wechseln. ISH Pepsin (Dako Omnis) muss bei korrekter Temperatur aufbewahrt werden.
	4b. Zu lange Pepsin-Behandlung oder sehr dünne Schnitte können zum Auftreten von Schatten- oder bikonkaven "Doughnut"-Zellen führen	4b. Erneut versuchen mit einem Färbeprotokoll mit kürzerer Pepsininkubationszeit. Die Schnittdicke muss 4-6 µm betragen.
5. Ausgeprägte grüne Auto-Fluoreszenz auf Objektträger, auch in Bereichen ohne FFPE-Gewebe	5. Es wurden verfallene oder nicht empfohlene Glasobjektträger angewendet.	5. Nur spezifizierte Glasobjektträger verwenden. Auf das Verfallsdatum der Glasobjektträger achten.

HINWEIS: Falls das Problem keiner der oben genannten Ursachen zugewiesen werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Anhang 1 – Brustkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code-Nr. GM333

Bewertungsschema

Datum des Durchlaufs: _____ Logbuch-ID des Färbedurchlaufs: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Charge: _____ Proben-ID: _____

Signale von 20 Zellkernen auszählen					
Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)	Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Gesamt (1-10)			Gesamt (11-20)		

Zum Ermitteln des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses wird bei denselben 20 Zellkernen die Anzahl der *HER2*-Signale und die Anzahl der *CEN-17*-Signale gezählt, woraufhin dann die Gesamtzahl der *HER2*-Signale durch die Gesamtzahl der *CEN-17*-Signale dividiert wird. Liegt das *HER2/CEN-17*-Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8-2,2), sind 20 weitere Zellkerne auszuzählen und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen erneut berechnet.

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Werts (1,8-2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren (siehe Leitfaden für die Signalzählung).

	<i>HER2</i>	<i>CEN-17</i>	<i>HER2/CEN-17-Verhältnis</i>
Gesamtwert (1-20)			

Signale von zusätzlichen 20 Zellkernen auszählen					
Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)	Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)
21			31		
22			32		
23			33		
24			34		
25			35		
26			36		
27			37		
28			38		
29			39		
30			40		
Gesamt (21-30)			Gesamt (31-40)		

HER2/CEN-17-Verhältnis basierend auf den 40 ausgezählten Zellkernen berechnen

	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17-Verhältnis
Gesamtwert (1-40)			

- Verhältnis < 2: HER2-Genamplifikation wurde nicht beobachtet
- Verhältnis ≥ 2: HER2-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in:

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin:

Hinweise zur Bewertung siehe Interpretation des Anfärbens.

Anhang 2 – Brustkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code-Nr. GM333

Spezifikationen des Fluoreszenz-Mikroskops

Dako empfiehlt folgende Ausstattung zur Anwendung mit HER2 IQFISH pharmDx™, (Dako Omnis), GM333:

1. Mikroskop – Ausführung

- Epifluoreszenz-Mikroskop

2. Lampe

- Quecksilberdampf Lampe, 100 Watt (es sind Aufzeichnungen über die Einschaltzeit zu führen)

3. Objektive

- Für das Screening des Gewebes sind Ölimmersionsobjektive 16x oder 20x zu verwenden.
- Für hochauflösende Vergrößerung und für die Signalauswertung der Signale werden nur Ölimmersionsobjektive, z.B. 100x, empfohlen.

4. Filter

Filter werden jeweils für spezifische Fluorochrome konzipiert und müssen entsprechend ausgewählt werden. Dako empfiehlt die Verwendung eines spezifischen DAPI-Filters in Kombination mit einem qualitativ hochwertigen Texas Red-/FITC-Doppelfilter.

- DAPI-Filter, z.B. "Chroma"-Filter Nr. 31000
- Texas Red-/FITC-Doppelfilter, z.B. Filter Nr. XF53 von Omega Optical oder Chroma-Filter Nr. 51006
- Texas Red- und FITC-Einzelfilter können für die Bestätigung und Auswertung genutzt werden.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filter sind für jeden Mikroskoptyp spezifisch und für die Interpretation ist die Nutzung der jeweils angemessenen Filter unerlässlich. Ausführlichere Informationen können vom Hersteller des Mikroskops oder vom zuständigen Dako-Repräsentanten eingeholt werden.

5. Öl

- Nicht fluoreszierendes Öl

Vorsichtsmaßnahmen

- Eine Quecksilberdampf Lampe von 50 Watt wird nicht empfohlen.
- Rhodamin-Filter können nicht verwendet werden.
- Dreifachfilter werden nicht empfohlen.

Ein nicht optimiertes Mikroskop kann Probleme beim Lesen der Fluoreszenzsignale verursachen. Es ist wichtig, dass die Lichtquelle nicht ihren Nutzbarkeitszeitraum überschritten hat und korrekt ausgerichtet und fokussiert wurde.

Hinsichtlich der Quecksilberdampf Lampe ist die Leistungsüberprüfung nach den Herstelleranleitungen durchzuführen. Vor einer Interpretation der Ergebnisse muss das Mikroskop gewartet und die korrekte Ausrichtung der Quecksilberdampf Lampe sichergestellt werden.

Damit eine Abschwächung der Fluoreszenz vermieden wird, ist sicherzustellen, dass die Probe so wenig Anregungslicht wie möglich ausgesetzt wird.

Vor dem ersten Durchführen der FISH-Technik wird empfohlen, das Einrichten des im Labor genutzten Mikroskops mit dem Hersteller zu diskutieren oder auf die Literatur Bezug zu nehmen.

Zusammenfassung und Erläuterung – Magenkrebs

Das humane *HER2*-Gen (auch *ERBB2* oder *NEU*) ist auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert das HER2-Protein bzw. p185^{HER2}. Als eine Membranrezeptor-Tyrosinkinase zeigt das HER2-Protein Rezeptorhomologie mit dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR oder HER1) (1-2). Das *HER2*-Gen liegt in allen normalen diploiden Zellen in 2 Kopien vor.

Bei einer großen Anzahl von Studien wurde eine Überexpression des HER2-Proteins und Amplifikation des HER2-Gens bei Magenkrebs nachgewiesen (siehe Beurteilung unter (23)). HER2-Positivität kann entweder durch das IHC- oder das FISH-Verfahren bei etwa 20% der Patienten nachgewiesen werden (23). Vorklinische In-vitro- und In-vivo-Studien haben erwiesen, dass Trastuzumab (Herceptin™) bei verschiedenen Magenkrebsmodellen wirksam ist, was zur Einleitung verschiedener klinischer Studien geführt hat (23-27).

Alle Patienten der von Hoffmann-La Roche AG gesponserten Phase-III-Studie BO18255 (ToGA: randomisierte multizentrische Open Label-Studie der Phase III zu Trastuzumab in Kombination mit einem Fluoropyrimidin und Cisplatin versus Chemotherapie allein als First-Line-Therapie bei Patienten mit HER2-positivem fortgeschrittenem Magenkrebs) wurden mithilfe des Dako HercepTest™ (IHC) und des Dako *HER2* FISH pharmDx™ Kit (FISH) ausgewählt (HER2-Positivität definiert als IHC 3+ oder FISH+ (HER2/CEN-17 $\geq 2,0$). Die Studie zeigte den klinischen Nutzen sowohl von HercepTest™ (IHC) als auch von *HER2* FISH pharmDx™ Kit (FISH) für die Beurteilung des HER2-Status bei Patienten mit fortgeschrittenem gastrischem Adenokarzinom oder Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs, bei denen eine Trastuzumab-Behandlung in Betracht gezogen wird.

Es wurden keine Patienten aufgenommen mit Tumoren ohne Genamplifikation, aber schwacher bis starker HER2-Proteinüberexpression [FISH(-)/IHC 2+]. Es ist deshalb unklar, ob Patienten mit Tumoren ohne Genamplifikation, aber HER2-Proteinüberexpression [FISH(-), IHC 2+ oder 3+], von einer Behandlung mit Herceptin™ profitieren würden. Die Studie zeigte zudem, dass Genamplifikation (FISH) und Proteinüberexpression (IHC) nicht so miteinander korreliert sind wie bei Brustkrebs. Deshalb sollte nicht nur eine einzelne Methode für die Bestimmung des HER2-Status angewendet werden.

Dieses Produkt (*HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)) ist ein IQFISH-Sondenmix für automatisierte, direkte FISH-Verfahren und erkennt *HER2*-Genamplifikationen. Dieses Produkt muss zusammen mit den spezifizierten Zusatzreagenzien im Dako Omnis Gerät verwendet werden und stammt vom manuell ausgeführten *HER2*-Genamplifikationsassay, *HER2* IQFISH pharmDx™, Code-Nr. K5731.

Prinzip des Testverfahrens – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist eine IQFISH-Sonde bestehend aus einer Mischung von mit Texas Red markierten DNA-Sonden, die eine Region von 218 kb abdecken, einschließlich des *HER2*-Gens auf Chromosom 17, sowie einer Mischung aus Fluorescein-markierten PNA(13)-Sonden, die auf die Centromer-Region von Chromosom 17 (CEN-17) abzielen. Die spezifische Hybridisierung der beiden Ziele resultiert in der Bildung eines deutlichen roten Fluoreszenzsignals an jedem *HER2*-Genlokus und eines deutlich erkennbaren grünen Fluoreszenzsignals an jedem der Centromere von Chromosom 17.

Die *HER2*-Genamplifikationsbeurteilung mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist ein vollautomatisches Verfahren auf dem Dako Omnis Gerät. Über die Dako Link Omnis Workstation Software können drei verschiedene validierte *HER2*-FISH-Färbeprotokolle ausgewählt werden. Die Protokolle unterscheiden sich nur bezüglich der Andauungszeit mit Pepsin, wobei 10 Minuten (kurzes Protokoll), 15 Minuten (mittleres Protokoll) und 20 Minuten (langes Protokoll) ausgewählt werden können (siehe Einzelheiten weiter unten). Das mittlere Protokoll wird für die anfängliche Analyse empfohlen.

Nach der Färbung im Dako Omnis werden die Proben mit Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) (Fluoreszenz-Eindeckmedium) fixiert, das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthält, und

mit einem Deckglas versehen. Mit einem mit den angemessenen Filtern (siehe Anhang 5) versehenen Fluoreszenz-Mikroskop werden die Tumorzellen lokalisiert und es erfolgt eine Auszählung der roten (*HER2*) und grünen (*CEN-17*) Signale. Daraufhin wird das *HER2/CEN-17*-Verhältnis berechnet. Im untersuchten Gewebeschnitt vorliegende normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle der Effizienz der Vorbehandlung und Hybridisierung.

Weitere Einzelheiten siehe den Abschnitt über die Interpretation der Anfärbung.

Anweisungen zum Laden und Entladen von Objektträgern, ISH Lids (Dako Omnis), Code-Nr. GC102, Reagenzien, Spülflüssigkeiten und Abfällen siehe Dako Omnis Handbücher.

Reagenzien – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die Zusatzreagenzien können separat als einzelne Reagenzien bestellt werden.

Mitgelieferte Materialien

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis): 1,6 mL, Ready-to-Use, Mischung von mit Texas Red markierten *HER2*-DNA-Sonden und Fluorescein-markierten *CEN-17* PNA-Sonden in einem IQFISH-Hybridisierungspuffer. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wird in Trockeneis verpackt ausgeliefert. **Um sicherzustellen, dass das Reagenz während des Transports keinen hohen Temperaturen ausgesetzt war, muss bei seiner Entgegennahme immer noch Trockeneis vorhanden sein.** Reagenzbehälter mit aufgetautem Inhalt müssen zu jeder Zeit in aufrechter Position gelagert oder verwendet werden.

Der Reagenzbehälter enthält ein goldbeschichtetes Metallkugeln für das Mischen im Dako Omnis Mixing Device (siehe Dako Omnis Mixing Device Handbuch). Es ist wichtig, das Reagenz gründlich zu mischen, bevor es in das Dako Omnis geladen wird.

Erforderliches, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltenes Material

Zusatzreagenzien

Die folgenden Reagenzien sind im Dako Omnis Gerät für die *HER2*-Genamplifikationsanalyse mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) erforderlich:

ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis): 175 mL, 20-fach konzentriert; wird in einer Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche (Code-Nr. GC109) verdünnt. Das Produkt enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff und einen inerten grünen Farbstoff, damit es einfacher erkennbar und anzuwenden ist.

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis): 14 mL 96%iges Ethanol (Ready-to-Use).

ISH Pepsin (Dako Omnis): 7 mL Pepsin A-Lösung (Ready-to-Use), pH 2,0; enthält einen Stabilisator und einen antimikrobiellen Wirkstoff. Pepsin wird in Trockeneis verpackt ausgeliefert.

Um sicherzustellen, dass das Reagenz während des Transports keinen hohen Temperaturen ausgesetzt war, muss bei seiner Entgegennahme immer noch Trockeneis vorhanden sein.

ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis): 175 mL Natriumzitatpuffer 20-fach konzentriert; wird 1:20 in einer Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche (GC109) verdünnt. Das Produkt enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff, ein Reinigungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff, damit es einfacher erkennbar und anzuwenden ist.

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis): 0,8 mL Fluoreszenz-Eindeckmedium (Ready-to-Use) mit DAPI.

Obwohl diese oben aufgeführten Reagenzien im Lieferumfang von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) nicht enthalten sind, werden sie unten kurz beschrieben. Bitte die Gebrauchsanweisung für jedes Produkt für weitere Einzelheiten beachten.

Zusätzliche Reagenzien und Geräte

Dako Omnis, Code-Nr. GI100

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), Code-Nr. GC807

Clearify™, Code-Nr. GC810

Dako Omnis Mixing Device, Code-Nr. GC116

ISH Lid, Code-Nr. GC102

ISH Cleaning Solution, Code-Nr. GC207

Deckgläser für die Eindeckung (24 mm x 50 mm)

Bitte das Dako Omnis Grundlegende Benutzerhandbuch und das Ausführliche Benutzerhandbuch für die Verwendung der zusätzlichen Reagenzien und Geräte beachten.

Mikroskopausstattung und Zubehör

Filter für das Fluoreszenz-Mikroskop: DAPI- und FITC-/Texas Red-Doppelfilter oder FITC- und Texas Red-Monofilter; weitere Einzelheiten siehe Anhang 5. Die Verwendung des DAPI-Filters mit großer Vergrößerung kann sich negativ auf die Signalintensität auswirken. Lange Expositionszeiten sind zu vermeiden.

Ein Fluoreszenz-Mikroskop mit einer 100-Watt-Quecksilberdampf Lampe als Lichtquelle ist zu empfehlen. Andere Lichtquellen werden für die Anwendung mit diesen Filtern nicht empfohlen.

Mappe für Mikroskop-Objektträger (Halter aus Pappe für 20 Objektträger mit beweglicher Klappe o.ä.).

Vorsichtsmaßnahmen – Magenkrebs

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für geschultes Fachpersonal.
3. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) enthält ≥ 10 - $< 25\%$ Ethylencarbonat und ≥ 3 - $< 5\%$ Natriumchlorid. *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist wie folgt bezeichnet:



Achtung

H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Augenschutz oder Gesichtsschutz tragen.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P305 + P351 + P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten.

Anwender sind gründlich und sorgfältig mit den Arbeitsverfahren, den gefährlichen Eigenschaften und den notwendigen Sicherheitsvorschriften vertraut zu machen. Zusätzliche Informationen siehe das Sicherheitsdatenblatt.

4. Gewebeproben müssen ebenso wie alle ihnen ausgesetzten Materialien vor und nach dem Fixieren in einer Weise behandelt werden, als seien sie zum Übertragen von Infektionen befähigt. Außerdem muss die Entsorgung unter Beachtung der korrekten Vorsichtsmaßnahmen erfolgen (14). Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Empfindliche Bereiche nach Kontakt mit den Reagenzien mit reichlich Wasser waschen.
5. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden, da dies falsche Ergebnisse hervorrufen könnte.

6. Verfahren der Gewebefixierung und Schnittdicken, die von den gemachten Angaben abweichen, können die Gewebemorphologie und/oder die Signalintensität beeinträchtigen.
7. Das Reagenz ist bereits optimal verdünnt. Eine weitergehende Verdünnung kann zu einem Leistungsverlust führen.
8. Um einen Kontakt mit Augen und Haut zu vermeiden, ist angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) zu tragen. Zusätzliche Informationen siehe das Sicherheitsdatenblatt.
9. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend den örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.
10. Aufgrund der Heterogenität von Magenkrebsproben muss unbedingt die gesamte Probe gründlich untersucht werden, um die Signalverteilung zu bewerten, bevor der Bereich für die Auszählung festgelegt wird.
11. Die Bewertung sehr kleiner Proben wird nicht empfohlen (d.h. die Proben müssen eine intakte Morphologie und genügend Zellkerne zur Auszählung aufweisen).
12. Um bei der *HER2* FISH-Analyse einer Biopsieprobe eine zuverlässige Bestimmung des *HER2*-Status zu gewährleisten, ist es erforderlich, mehrere (7-8) Biopsien aus verschiedenen Regionen des Tumors zu analysieren.
13. Für die Ermittlung aller Gewebekerne in einer Biopsieprobe ist es wichtig, den H- und E-angefärbten Objektträger zu kontrollieren.
14. Die *HER2*-Genamplifikation und -Proteinüberexpression korreliert bei Magenkrebs nicht so gut wie bei Brustkrebs, weshalb mehr als eine einzelne Methode für die Bestimmung des *HER2*-Status angewendet werden muss.

Aufbewahrung – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) muss bei ≤ -18 °C (-18 bis -25 °C wird empfohlen) an einem dunklen Ort gelagert werden. Aufgetaute Reagenzbehälter müssen immer in aufrechter Position aufbewahrt werden. Einfrieren und Auftauen der Reagenzien bis zu 10 Mal führt zu keiner Leistungsbeeinträchtigung. Diese Komponente nicht zu lange der Raumtemperatur aussetzen.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die Zusatzreagenzien ISH Pepsin (Dako Omnis) und Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) können durch Wärmeeinwirkung beeinträchtigt werden. Diese Kit-Komponenten dürfen nicht Raumtemperatur ausgesetzt werden.

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und das Zusatzreagenz Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) können durch starke Lichteinwirkung beeinträchtigt werden. Die Lagerung dieser Komponenten oder die Durchführung des Färbeverfahrens darf nicht unter intensiver Lichteinstrahlung, wie z.B. direktem Sonnenlicht, erfolgen.

Die Zusatzreagenzien ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis), ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Stringent Wash Buffer (20) (Dako Omnis) und Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) müssen an einem dunklen Ort bei 2-8 °C gelagert werden. ISH Pepsin (Dako Omnis) muss bei -18 bis 8 °C gelagert werden. Der Behälterdeckel bzw. Klappdeckel muss bei allen Reagenzien während der Lagerung geschlossen sein.

Verdünnte Lösungen (Arbeitslösungen von ISH Stringent Wash Buffer und ISH Pre-Treatment Solution) können bei 2-8 °C 30 Tage lang aufbewahrt werden.

Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf dem Reagenzbehälter angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden. Während der Lagerung müssen die Deckel bzw. Klappdeckel geschlossen sein. Werden die Reagenzien nicht unter den genannten Bedingungen aufbewahrt, muss die Reagenzleistung vom Anwender validiert werden (15).

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Folglich ist es wichtig, dass die im untersuchten Gewebeschnitt vorliegenden gesunden Zellen bewertet werden. Wenn ein unerwartetes Fluoreszenzmuster beobachtet und ein Problem mit *HER2* IQFISH pharmDx™ vermutet wird, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

Stabilität im Dako Omnis Gerät

Die Stabilitätsdauer von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die der Zusatzreagenzien ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) und ISH Pepsin (Dako Omnis) im Gerät beträgt 80 Stunden. Die Stabilität von verdünnter ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) und ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) im Gerät beträgt 7 Tage. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert. Bei Verwendung abgelaufener Reagenzien wird vom Dako Omnis Gerät eine Warnung ausgegeben; alle mit dem abgelaufenen Reagenz eingefärbten Objektträger ändern ihren Status auf "Suspicious" (Verdächtig), und das Objektträger-Protokoll auf der Arbeitsstation zeigt an, dass ein abgelaufenes Reagenz verwendet wurde.

Probenvorbereitung – Magenkrebs

Die Handhabung von Biopsie-, Exzisions- oder Resektionsproben bei gastrischem Adenokarzinom oder Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs muss dergestalt erfolgen, dass die Gewebe für die FISH-Analyse erhalten bleiben. Für alle Proben müssen Standardmethoden der Gewebeerarbeitung für das immunhistochemische Anfärben genutzt werden (16). Bei der Untersuchung von Biopsieproben mit sehr wenig Gewebe müssen eine intakte Tumormorphologie und das Vorliegen einer ausreichenden Anzahl an Zellkernen für die Auszählung gewährleistet

sein. Um bei der *HER2* FISH-Analyse einer Biopsieprobe eine zuverlässige Bestimmung des *HER2*-Status zu gewährleisten, ist es erforderlich, mehrere (7-8) Biopsien aus verschiedenen Regionen des Tumors zu analysieren.

Paraffineingebettete Schnitte

Für die Verwendung sind nur in neutralem gepuffertem Formalin konservierte und paraffineingebettete Schnitte geeignet. Von Proben sollten beispielsweise Präparatblöcke mit einer Dicke von 3 mm oder 4 mm angefertigt werden, gefolgt von 18-24 Stunden Fixierung in neutralem gepuffertem Formalin. Für die ToGA-Studie wurden Biopsieproben für 6-8 Stunden fixiert [Studienreferenz siehe (28)]. Die Gewebe werden dann in einer abgestuften Ethanol- und Xylolreihe dehydriert und anschließend bei höchstens 60 °C mit geschmolzenem Paraffin infiltriert. Korrekt fixierte und eingebettete Gewebelöcke sind vor Anfertigung der Schnitte und deren Eindecken auf Objektträgern unbegrenzt haltbar, wenn sie an einem kühlen Ort (15-25 °C) aufbewahrt werden(16-17). Andere Fixative sind nicht geeignet.

Von den Gewebeproben müssen Schnitte von 3-6 µm angefertigt werden.

Die für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation wie auch für die Verifikation des Vorliegens des Tumors benötigten Objektträger werden zur gleichen Zeit vorbereitet. Es wird empfohlen, mindestens zwei Serienschnitte von Gewebeproben anzufertigen: ein Schnitt wird zum Tumornachweis mit Hämatoxylin und Eosin (H- und E-Anfärbung) angefärbt und ein Schnitt dient für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation. Es wird empfohlen, die Gewebeschnitte auf Dako FLEX IHC Mikroskop-Objektträgern, Code-Nr. K8020, aufzuziehen. Superfrost Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific, J1800AMNZ) sind ebenfalls geeignet. Auf das Verfallsdatum der Glasobjektträger achten. Im Allgemeinen sollten Proben, die bei 2-25 °C aufbewahrt werden, innerhalb von < 6 Monaten nach dem Schneiden analysiert werden.

HINWEIS: Die Gewebeproben müssen sich auf dem Glasobjektträger innerhalb des definierten Färbereichs des Objektträgers befinden. Abmessungen des Färbereichs des Objektträgers siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis.

GEBRAUCHSANWEISUNG – Magenkrebs

A. Vorbereitung der Reagenzien – Magenkrebs

A.1 *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)

Der Behälter mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) enthält ein goldbeschichtetes Metallkugeln für das Mischen. Bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen werden kann, muss das Reagenz aufgetaut und gründlich gemischt werden, da beim Einfrieren eine Phasentrennung stattfindet.

Für das Mischen der Sonde dient das Mischgerät Dako Omnis Mixing Device.

Den unten aufgeführten Ablauf beim Mischen der Sonde mit dem Dako Omnis Mixing Device sowie für weitere Einzelheiten das Handbuch zum Mixing Device beachten.

1. Behälter mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) aus dem Tiefkühlschrank nehmen.
2. Den Behälter dann in das Dako Omnis Mixing Device laden.
3. Mixing Device anschließen und darauf achten, dass die grüne Statusleuchte leuchtet.
4. Das Programm "Thaw + mix" (Auftauen und Mischen) auswählen. **Wichtig:** Behälter, die bei **weniger** als -25 °C gelagert wurden, sollten (erst kurz) vor dem Laden in das Dako Omnis Mixing Device aufgetaut und mit dem Programm "Mix" (Mischen) verarbeitet werden.
5. Behälter aus dem Mixing Device nehmen.
6. Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten (siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis für Einzelheiten).

7. Den Behälter dann umgehend in das Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis Geräts laden. Wenn während des Färbedurchlaufs die Funktion für kontinuierliches Reagenzladen angewendet wird, muss die Zeit zwischen Mischen und Aspiration des Behälters im Dako Omnis mindestens 10 Minuten betragen.

Die *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Sonde kann erneut aufgetaut und bis zu 10 Mal wiederverwendet werden.

Der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Sondenmix muss immer kurz vor dem Laden im Gerät gemischt werden. Nicht schütteln. Die Stabilität von ISH *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) im Gerät beträgt insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) muss nach der Phase im Innern des Dako Omnis umgehend an einen Ort mit $< -18\text{ °C}$ (-18 bis -25 °C wird empfohlen) umgelagert werden.

A.2 ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) im Verhältnis von 1:20 wie folgt herstellen:

1. Eine Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche mit PTB-Zeichen (blaues Etikett) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Eine 175-mL-Flasche mit konzentrierter ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und die Spülflasche scannen).
5. Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei $2-8\text{ °C}$ 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens 18 °C erreichen, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübte verdünnte Lösung entsorgen.

A.3 ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen des konzentrierten ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) im Verhältnis von 1:20 wie folgt herstellen:

1. Eine Dako Omnis 3,5-L-Spülflasche mit PTB-Zeichen (blaues Etikett) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
2. Eine 175-mL-Flasche mit konzentriertem ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren.
3. Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
4. Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und danach die Spülflasche scannen).
5. Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis Gerät aufbewahrt wird. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C bis zu 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens 18 °C erreichen, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübbte verdünnte Lösung entsorgen.

A.4 ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)

ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Den Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen wird.

Die Stabilität von ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Nach dem Durchlauf kann die ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (2-8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.

A.5 ISH Pepsin (Dako Omnis)

ISH Pepsin (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Zuerst auftauen und den Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor der Behälter in das Dako Omnis geladen wird.

Die Stabilität von ISH Pepsin (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagenzienvorratsmodul des Dako Omnis. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert (siehe oben). Nach dem Durchlauf muss ISH Pepsin (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (-18 bis 8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.

A.6 Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis)

Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Eindeckmedium, das außerhalb des Dako Omnis Geräts verwendet wird. Nach der Anwendung das Fluoreszenz-Eindeckmedium umgehend auf Lagertemperatur (2-8 °C) bringen.

A.7 Weiteres Zubehör

Folgendes Zubehör muss zusätzlich im Dako Omnis vorhanden sein: entionisiertes Wasser, verdünnter Wash Buffer 20x (Dako Omnis) Code-Nr. GC807, Clearify™ (Dako Omnis) Code-Nr. GC810, ISH Cleaning Solution, Code-Nr. GC207 sowie das ISH Lid (Dako Omnis) Code-Nr. GC102, wie in den Dako Omnis Handbüchern angegeben.

B. Färbeverfahren – Magenkrebs

B.1 Verfahrensanleitung

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) ist die Hybridisierungsprobe für den automatisierten In-situ-Hybridisierungstest unter direkter Fluoreszenz (FISH) im Dako Omnis Gerät und ist, zusammen mit den Zusatzreagenzien GM300, GM301, GM302, GM303 und GM304 (GM304 außerhalb des Geräts), vorgesehen für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation. Vor der Verwendung sind alle Anweisungen genau durchzulesen und der Benutzer muss sich mit allen Komponenten und Vorsichtsmaßnahmen vertraut machen.

Das automatisierte Verfahren des Dako Omnis umfasst die Entparaffinierung von Gewebeschnitten, Demarkierung, Pepsinbehandlung, Hybridisierung und stringent Waschen. Die Objektträger werden in die trockene Entladestation entladen. Alle Protokollschritte sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert.

Anweisungen zum Laden von Objektträgern, ISH Lids (Dako Omnis), Reagenzien usw. siehe Dako Omnis Handbücher. Es gibt drei validierte *HER2* IQFISH-Protokolle, *HER2* IQFISH Pepsin Short (kurzes Protokoll), *HER2* IQFISH Pepsin Medium (mittleres Protokoll) und *HER2* IQFISH Pepsin Long (langes Protokoll), die sich lediglich bezüglich der Pepsinandaunungszeit unterscheiden, in der Dako Omnis Software vorprogrammiert sind und für jeden der fünf Objektträger im Objektträgerhalter ausgewählt werden können. Dies ermöglicht eine optimale Gewebeandaunung, die von den Bedingungen vor der Analyse abhängen kann. Das Protokoll *HER2* IQFISH Pepsin Medium (mittleres Protokoll) wird als Standardprotokoll betrachtet. Über die Dako Link Omnis Workstation können die verschiedenen Färbeprotokolle aufgerufen werden.

B.2. Vor dem Färbeverfahren

1. In der Dako Link Omnis Workstation-Software unter den IQFISH-Protokollen das *HER2* IQFISH-Protokoll für jeden Objektträger auswählen.
2. Etiketten für jeden Träger ausdrucken und auf den Glasobjektträgern befestigen.
3. Die Objektträger dann in den Objektträgerhalter setzen. Detaillierte Anweisungen siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis. Der Objektträgerhalter ist groß genug für einen bis fünf Objektträger. Es ist ratsam, mindestens zwei Objektträger in einem *HER2* IQFISH-Färbedurchlauf zu färben.
4. Den Objektträgerhalter in das Dako Omnis laden.
5. Das ISH Lid (ein ISH Lid pro Objektträgerhalter) in das Dako Omnis laden.
6. Es müssen sich Spülflaschen mit Flüssigkeit im Gerät befinden, die durch das Dako Omnis Gerät registriert wurden. Flüssigkeiten für Spülflaschen: Clearify™ (Intermedium), verdünnte ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), verdünnter ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) und verdünnter Wash Buffer (Dako Omnis).
7. Die ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) und das ISH Pepsin (Dako Omnis) sowie die frisch gemischten *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) und die ISH Cleaning Solution in das Reagenzienvorratsmodul laden. Alle Klappdeckel müssen offen sein.
8. Die Anweisungen auf dem Touchscreen befolgen und auf "Done" tippen, damit das Färbeverfahren gestartet wird.

B.3. Färbeverfahren

Das *HER2* IQFISH-Färbeverfahren mit dem Dako Omnis Gerät (siehe Tabelle 11 für einen Überblick) kann auf der Dako Link Omnis Workstation überwacht werden:

Tabelle 11. Vereinfachter Überblick über die Protokollschritte für das *HER2* IQFISH-Färbeverfahren.

Schritt	Reagenz	Zeit und Temperatur
Wachsentfernung	Clearify™ (Intermedium)	10 Minuten, 38 °C
Demaskierung	ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis)	15 Minuten (97 °C)
Waschung	ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis)	2 x 3 Minuten, 32 °C
Andaunung *	ISH Pepsin (Dako Omnis)	10, 15 oder 20 Minuten
Trocknung		15 Minuten, 45 °C
Denaturierung		10 Minuten, 66 °C
Hybridisierung	<i>HER2</i> IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis)	75 Minuten, 45 °C
Stringente Waschung	ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis)	10 Minuten, 61 °C

* Es kann über die oben erwähnten *HER2* IQFISH-Protokolle aus drei validierten Pepsinandaunungszeiten ausgewählt werden.

Wenn keine weiteren ISH-Färbungen anstehen, müssen alle Reagenzien im empfohlenen Temperaturbereich aufbewahrt werden.

B.4. Nach dem Färbeverfahren

Die Objektträger entladen und bis zu 30 µL Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) mit DAPI auf den Zielbereich des Objektträgers applizieren. Der Gewebeschnitt muss vollständig von Fluorescence Mounting Medium (Dako Omnis) bedeckt sein. Ein Deckglas darüber legen.

HINWEIS: Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger kann nach 15 Minuten oder innerhalb von 7 Tagen nach dem Eindecken erfolgen. Es kommt allerdings zu Verblässen, falls die Objektträger Licht oder hohen Temperaturen ausgesetzt werden. Um ein Verblässen so gering wie möglich zu halten, sind die Objektträger bei –18 bis 8 °C im Dunkeln aufzubewahren.

Qualitätskontrolle – Magenkrebs

1. Signale müssen hell, distinkt und leicht zu bewerten sein.
2. Normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle für den Färbedurchlauf.
 - Normale Zellen sollten ein bis zwei deutlich sichtbare grüne Signale geben und darauf hinweisen, dass die CEN-17 PNA-Sonde eine erfolgreiche Anlagerung an die Centromer-Region von Chromosom 17 erreicht hat.
 - Normale Zellen sollten außerdem ein bis zwei deutlich sichtbare rote Signale erbringen und darauf hinweisen, dass eine erfolgreiche Anlagerung der *HER2*-DNA-Sonde an das *HER2*-Gen stattfand.
 - Bedingt durch das Mikrotomieren werden einige normale Zellen weniger als die für jede Farbe erwarteten zwei Signale erbringen.
 - Werden bei gesunden Zellen keine Signale nachgewiesen, weist dies auf ein Assay-Versagen hin und die Ergebnisse müssen als ungültig betrachtet werden.
3. Bei der Bewertung mit einem DAPI-Filter muss die nukleare Morphologie intakt sein. Zahlreiche schemenhafte Schattenzellen und eine generell schlechte nukleare Morphologie verweisen auf übermäßige Andauung der Probe, die in Signalverlust oder -fragmentierung resultiert. Solche Proben müssen als ungültig angesehen werden.
4. Mindestens 20 Tumorzellen müssen auswertbar sein.
5. Unterschiede bei der Gewebefixierung und -einbettung im Labor des Anwenders können Variationen der Resultate hervorrufen und eine regelmäßige Evaluation der laborinternen Kontrollen erforderlich machen.

Interpretation des Anfärbens – Magenkrebs

Auswertbares Gewebe

Den Tumor innerhalb des Kontextes des mit dem H- und E-Verfahren angefärbten Objektträgers lokalisieren und denselben Bereich auf dem mit dem FISH-Verfahren verarbeiteten Objektträger (im DAPI-Filter) bewerten. Nur Proben von Patienten mit gastrischem oder Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs können analysiert werden. In Fällen mit intestinaler Metaplasie und Adenokarzinom in derselben Probe sollte nur die Karzinomkomponente ausgewertet werden. Stark entzündete und nekrotische Bereiche sowie Bereiche, in denen die nuklearen Säume mehrdeutig sind, sind zu vermeiden. Es dürfen keine Zellkerne einbezogen werden, bei denen eine subjektive Bewertung vorgenommen werden muss. Zellkerne mit schwacher Signalintensität und unspezifischer Hintergrundfärbung dürfen nicht einbezogen werden.

Zu Beginn jeweils mikroskopisch den gesamten mit dem FISH-Verfahren angefärbten Bereich und den auf dem H- und E-Schnitt bestimmten Bereich bewerten. Vor der Auszählung eines mit dem FISH-Verfahren angefärbten Bereichs die Gesamt-Signalverteilung (homogen oder heterogen) auf dem Auszählungsblatt notieren. Bei einer heterogenen Verteilung darauf achten, ob eine fokale Amplifikation oder eine Einzel-Zell-Amplifikation (mosaikartig) vorliegt.

1) *Homogene Signalverteilung*

Bei homogener Signalverteilung jeweils die Anzahl der Centromere der Chromosomen (grüne Signale) und die Anzahl der *HER2*-Gene (rote Signale) von 20 Zellen in 1-2 repräsentativen Tumorbereichen bewerten.

2) *Heterogene Signalverteilung*

Bei heterogener Signalverteilung können insgesamt 20 Zellen aus Bereichen gemäß Angaben unten ausgezählt werden:

A) Bei Vorliegen einer fokalen Amplifikation müssen Bereiche mit amplifizierten Zellen ausgewählt werden.

B) Bei Vorliegen einer mosaikartigen Verteilung oder amplifizierter, polysomaler und disomaler Zellen muss in Bereichen mit amplifizierten Zellen gezählt werden. In diesen Bereichen müssen nicht nur amplifizierte Zellen, sondern auch anliegende nicht amplifizierte Zellen bis zu einer Gesamtzahl von 20 Zellen gezählt werden.

Möglichst keine überlappenden Bereiche auswählen.

Die Färbung bakterieller DNA ist vernachlässigbar.

Eine Reihe spezialisierter Zellen (Mastzellen und Makrophagen), die verstreut im Magengewebe vorhanden sind, weisen aufgrund des Vorhandenseins bakterieller DNA eine starke Färbung durch die *HER2*-Sonde auf. Das führt zu stark rot fluoreszierenden Zellen, die sich deutlich von Tumorzellen mit einer hohen *HER2*-Genamplifikation unterscheiden.




Auszählung

Nachdem ein Bereich für die Auszählung ausgewählt wurde, bei einem der 20 ausgewählten benachbarten Zellkerne mit der Analyse beginnen und dann Zelle für Zelle zählen, wobei nur solche Zellkerne ausgelassen werden, die die Qualitätsanforderungen nicht erfüllen. Den Tumor innerhalb des Kontextes des mit dem H- und E-Verfahren angefärbten Objektträgers lokalisieren und den gleichen Bereich auf dem mit dem FISH-Verfahren verarbeiteten Objektträger bewerten. Den gesamten gefärbten Objektträger untersuchen, um Ursachen für mögliche Heterogenität festzustellen. Einen Bereich auswählen, der durch gute Verteilung der Zellkerne gekennzeichnet ist. Mit der Analyse am linken oberen Quadranten des ausgewählten Bereichs beginnen. Die mikroskopische Untersuchung von links nach rechts vornehmen und die Anzahl der Signale innerhalb des nuklearen Saums jedes bewerteten Zellkerns nach den unten angeführten Leitlinien auszählen (siehe auch Anhang 5).

- Auf- und abwärts fokussieren, um alle Signale im jeweiligen Zellkern ausfindig zu machen.
- Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht. Die Distanz muss mindestens so groß sein wie der Durchmesser eines Signals normaler Größe, damit zwei einzelne Signale gezählt werden können. Wenn die Distanz zwischen zwei Signalen geringer ist als der Durchmesser eines Signals, müssen diese als ein Signal gezählt werden.
- Bei Zellkernen mit hohem Niveau der *HER2*-Genamplifikation können die *HER2*-Signale sehr nahe aneinander liegen und einen Signal-Cluster bilden. In diesen Fällen kann die Anzahl der *HER2*-Signale nicht ausgezählt werden und es muss eine Schätzung erfolgen. Besondere Aufmerksamkeit muss den grünen Signalen gewidmet werden, da Cluster von roten *HER2*-Signalen die grünen Signale verdecken können, sodass sie nicht sichtbar sind. Im Zweifelsfall sind die grünen Signale mithilfe eines spezifischen FITC-Filters zu kontrollieren.

Zellkerne ohne Signale oder mit nur eine Farbe aufweisenden Signalen dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden. Nur solche Zellkerne bewerten, die ein oder mehrere FISH-Signale jeder Farbe zeigen.

Leitfaden für die Signalzählung

1		Nicht in die Zählung aufnehmen. Zellkerne überlappen einander, nicht alle Bereiche der Zellkerne sichtbar.
2		Zwei grüne Signale; Zellkerne mit nur einer Signalfarbe dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden.
3		Als 3 grüne und 12 rote Signale zählen (Cluster-Schätzung).
4		Als 1 grünes und 1 rotes Signal zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
5		Nicht in die Zählung aufnehmen (übermäßige oder zu geringe Andauung der Zellkerne). Fehlende Signale in der Mitte der Zellkerne (ringförmige Zellkerne).
6		Als 2 grüne und 3 rote Signale zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
7		Als 1 grünes und 5 rote Signale zählen.
8		Als 3 grüne (1 grünes Signal mit verschwommenem Fokus) und 3 rote Signale zählen.
9		Cluster roter Signale kaschieren grüne Signale. Grüne Signale mit einem spezifischen FITC-Filter überprüfen oder nicht in die Zählung aufnehmen.

Zählungen wie in Anhang 3 und 4 verdeutlicht in einer Tabelle aufzeichnen.

Pro Gewebeprobe werden 20 Zellkerne ausgezählt, und zwar wo möglich von deutlich erkennbaren Tumorbereichen.

Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis wie folgt berechnen: Dividieren der Gesamtzahl roter *HER2*-Signale durch die Gesamtzahl grüner *CEN-17*-Signale.

Für Proben mit einem *HER2/CEN-17*-Verhältnis über oder gleich 2 ist die Amplifikation des *HER2*-Gens anzunehmen (29).

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Wertes (1,8-2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Liegt das Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8-2,2), sind 40 weitere Zellkerne auszuzählen, und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen berechnet. Liegt die Auszählung weiterhin im grenzwertigen Bereich, gilt das Ergebnis der zweiten Bewertung. Für eine bessere Orientierung während der zweiten Auszählung sollte, falls verfügbar, eine *HER2*-immunhistochemische Färbung einbezogen werden.

Im Zweifelsfall ist eine erneute Bewertung des Objektträgers vorzunehmen. Bei Fällen im Borderline-Bereich sollte eine Konsultation zwischen dem Pathologen und dem behandelnden Arzt stattfinden.

Beschränkungen – Magenkrebs

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Dako Omnis Geräten.
2. Spezielle Schulung ist erforderlich für die Gewebe- und Objektträgervorbereitung und Auswertung der IQFISH-Färbung. Die Interpretation der Färbung mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) darf nicht durch Personen mit Farbsehstörungen erfolgen.
3. Mit dem FISH-Verfahren erhaltene Resultate sind von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färbeschritt abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, falsches Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten können die Sondenhybridisierung beeinflussen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.

Leistungseigenschaften – Magenkrebs

Hybridisierungseffizienz

Die Hybridisierungseffizienz von *HER2* IQFISH pharmDx™ wurde unter Anwendung von 180 formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten untersucht, die in drei verschiedenen Studienzentren getestet wurden. Alle 180 Gewebeschnitte konnten in Übereinstimmung mit den Produktausverzeichnistrichtlinien benannt werden. Die Hybridisierungseffizienz betrug 100%.

Die berechneten und in den Studien zu den Leistungseigenschaften verwendeten *HER2/CEN-17*-Verhältnisse basieren auf der Auszählung von Signalen aus 20 Zellkernen unter Verwendung der Bewertungsrichtlinien im Abschnitt Interpretation des Anfärbens in dieser Gebrauchsanweisung.

Analytische Empfindlichkeit

Bei der Untersuchung der analytischen Empfindlichkeit von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurden 20 verschiedene Proben von gastrischen Adenokarzinomen (zehn Proben mit Amplifikation des *HER2*-Gens und zehn ohne Amplifikation) verwendet. Auf der Grundlage des Auszählens von 20 Zellkernen von normalen Zellen in der Gewebeprobe wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl von *HER2*-Signalen und CEN-17-Signalen berechnet. Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis für die 20 Gewebeproben der gastrischen Adenokarzinome lag zwischen 0,94 und 1,19.

Analytische Spezifität

Zur Bestätigung einer Gesamtabdeckung von 218 kb einschließlich des *HER2* -Gens wurden die *HER2*-DNA-Sonden im *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) der Endsequenzierung und Kartierung unterzogen.

Die CEN-17-PNA-Sonden im *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) wurden einzeln und in Kombination miteinander getestet, um ihre spezifische Hybridisierung der Centromer-Region von Chromosom 17 zu bestätigen.

Um eine Kreuz-Anlagerung an andere Chromosomen als an Chromosom 17 auszuschließen, wurden nach Maßgabe der von Dako genutzten Verfahren der Qualitätskontrolle Studien an Metaphasen-Spreads durchgeführt. Insgesamt 275 Metaphasen-Ausdehnungen mit deutlichen Signalen wurden auf die spezifische

Hybridisierung der *HER2*-DNA und des CEN-17 PNA Probe Mixes bewertet. In allen 275 Fällen war die Hybridisierung spezifisch für Chromosom 17. In keinem der 275 Fälle wurde Cross-Hybridisierung mit Loci anderer Chromosomen beobachtet. Die Sondenspezifität betrug also 100% (275 von 275).

Um die Eigenschaft des IQFISH Assay zu bestimmen, allein die Zielsubstanzen *HER2* und CEN-17 ohne Interferenz mit anderen Substanzen zu identifizieren, wurden Proben von gastrischen Adenokarzinomen unter Weglassen der *HER2*- und CEN-17 Sonden aus dem Hybridisierungsmix mit dem Hybridisierungspuffer alleine untersucht. Insgesamt 20 Proben wurden auf das Vorliegen von Signalen hin bewertet, die nicht auf den Sondenmix zurückzuführen waren. In keiner der 20 Proben wurden Zielregionen anderer Chromosomen oder Interferenzen mit nahe verwandten Substanzen detektiert.

Studien zur Robustheit

Testung der Robustheit des *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assays erfolgte anhand von unterschiedlichen PNA-Sondenkonzentrationen, Demarkierungszeiten, Pepsin-Inkubationszeiten, Denaturierungszeiten, Hybridisierungszeiten sowie Zeiten und Temperaturen des Waschschriffs mit adstringierendem Puffer. Die unterschiedlichen Parameter wurden an drei verschiedenen FFPE-Gewebeproben gastrischer Adenokarzinome und zwei FFPE-Gewebeproben des gastroösophagealen Übergangs getestet (es wurden in beiden Gruppen amplifizierte und nicht amplifizierte Gewebeproben verwendet).

Alle Parameter wurden sowohl unterhalb als auch oberhalb der Standardprotokolleinstellungen getestet, ausgenommen die PNA-Sondenkonzentration und Temperatur des Waschschriffs mit adstringierendem Puffer. Für diese wurde die Standardprotokolleinstellung bei der Einrichtung berücksichtigt.

Die Testparameter waren:

PNA-Sondenkonzentration: Getestet bei 100% und +/-17%.

Demarkierungszeit: Getestet bei 13 min 45 s und 16 min 15 s.

Pepsin-Inkubationszeit: Getestet bei 14 min 45 s und 16 min 15 s.

Denaturierungszeit: Getestet bei 9 min 45 s und 10 min 45 s.

Hybridisierungszeit: Getestet bei 70 min und 80 min.

Waschzeit mit adstringierendem Puffer: Getestet bei 8 min 45 s und 11 min 15 s.

Waschtemp. mit adstringierendem Puffer.: Getestet bei 59 °C, 61 °C und 63 °C.

Die drei PNA-Sondenkonzentrationen wurden, wie in Tabelle 12 gezeigt, in einem fraktionierten Design of Experiment (JMP-Tool, SAS) ausgewertet, das mit 12 verschiedenen Färbeprotokollen durchgeführt wurde.

Tabelle 12. Zwölf verschiedene in der Studie zur Robustheit verwendete Färbeprotokolle.

Robustheit Protokoll Nr.	Testparameter						
	Demarkierungszeit (min)	Pepsin-Zeit (min)	Denaturierungszeit (min)	Hybridisierungszeit (min)	Waschzeit m. adstr. Puffer (min)	Waschtemp. m. adstr. Puffer (°C)	PNA-Konz. im Sonden- mix
1	16,25	16,25	9,75	80	8,75	59	83%
2	13,75	14,75	10,75	70	8,75	59	100%
3	16,25	14,75	9,75	70	8,75	63	100%
4	13,75	14,75	10,75	80	8,75	61	83%
5	13,75	14,75	9,75	80	11,25	59	117%
6	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	83%
7	13,75	16,25	10,75	70	11,25	63	100%
8	16,25	14,75	9,75	70	11,25	61	83%
9	13,75	16,25	9,75	70	8,75	61	117%
10	16,25	16,25	10,75	70	11,25	59	117%
11	16,25	16,25	10,75	80	11,25	61	100%
12	16,25	14,75	10,75	80	8,75	63	117%

Alle fünf Gewebeproben wurden mit jeweils nach allen 12 Protokollen gefärbt.

Die Sichtanzeigen der Studie zur Robustheit waren Signalintensität und morphologische Qualität. Jedes Protokoll führte zu Färbereaktionen in allen Gewebeproben (60 insgesamt) mit hellen, deutlichen sowie leicht zu bewertenden und damit für die Signalauszahlung geeigneten Signalen.

Außerdem wurde die Auswirkung der Gewebedicke auf die Ergebnisse des *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assay mit unterschiedlichen Schnittdicken der FFPE-Magenkrebsgewebeproben getestet.

Insgesamt wurden fünf konsekutive Schnitte aus fünf Proben gastrischer Adenokarzinome unterschiedlicher Dicke (3, 4, 5, 6, und 7 µm) mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) getestet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient des *HER2*/CEN-17-Verhältnisses betrug 3,9% (zwischen 3,2% und 5,0%).

Reproduzierbarkeit

Die Tag-zu-Tag und Charge-zu-Charge-Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors wurde mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) getestet. Die Studie wurde als interne, verblindete, randomisierte Studie des *HER2*/CEN-17-Verhältnisses ausgelegt. Es wurden Schnitte von acht verschiedenen formalinfixierten paraffineingebetteten Magenkrebsproben, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs, mit unterschiedlichen Anteilen an *HER2*-Genamplifikationen verwendet. Diese acht Proben wurden mit dem HercepTest™ getestet und enthielten zwei Proben mit Status *HER2* IHC 0/1+, zwei Proben mit Status *HER2* IHC 2+, zwei Proben mit Status *HER2* IHC 3+ und zwei Proben mit einem vorbestimmten *HER2*/CEN-17 FISH-Verhältnis zwischen 1,5 und 2,5, das mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) erzielt wurde. Jede Probe wurde mit drei verschiedenen Chargen *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) an fünf nicht konsekutiven Tagen gefärbt. Für die gesamte Studie wurden insgesamt 240 Gewebefärbungen verarbeitet, da jede Kombination doppelt gefärbt wurde. Variationen des Verhältnisses zwischen Tagen und Chargen werden in Abbildung 8 gezeigt. Die Daten wurden mithilfe einer Box-Cox-Transformation über ein Random-Effect-Modell analysiert,

um Varianzhomogenität für die Daten zu erreichen. Der Gesamt-Variationskoeffizient wurde auf 6,5% geschätzt und es wurde festgestellt, dass Tages- und Chargenvariation mit 0,7% bzw. 0,8% dazu beitragen.

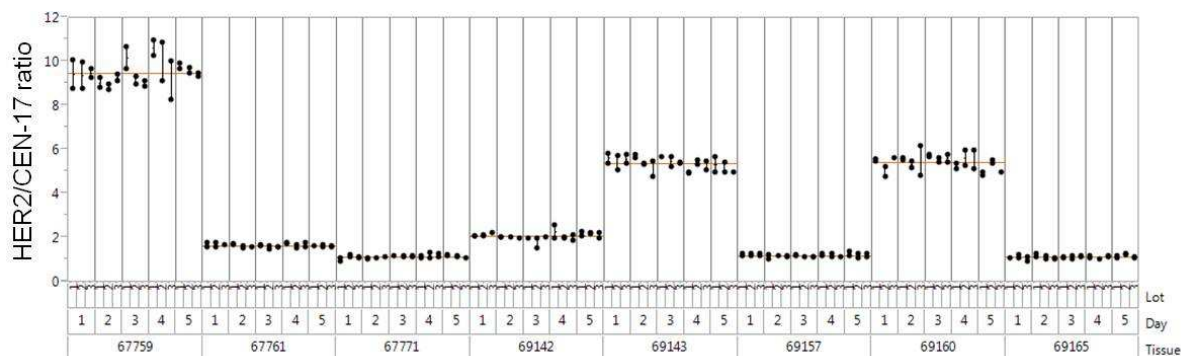


Abb. 8. *HER2/CEN-17*-Verhältnisse aus einer Studie zur Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors für *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis), einschließlich der Endpunkte Charge-zu-Charge- und Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit. Der Durchschnittswert für jede Gewebeprobe wird mit einer horizontalen Linie dargestellt.

Zusätzlich wurden die Tag-zu-Tag- und Studienort-zu-Studienort-Reproduzierbarkeit für *HER2 IQFISH pharmDx™* (Dako Omnis) extern in einer stratifizierten und verblindeten Studie an drei Studienorten (einer in den USA und zwei in Europa) an Gewebeschnitten von 12 verschiedenen formalinfixierten paraffineingebetteten Proben gastrischer Adenokarzinome, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs getestet. Drei Proben hatten den Status *HER2 IHC 0/1+*, drei *HER2 IHC 2+*, drei *HER2 IHC 3+* und drei Proben wiesen ein vorbestimmtes *HER2/CEN-17 FISH*-Verhältnis zwischen 1,5 und 2,5, das jeweils mit dem HercepTest™ und *HER2 IQFISH pharmDx™* (Code K5731) erzielt wurde. Die Proben wurden in den Studienzentren gefärbt und analysiert. Jede Gewebeprobe wurde mindestens sieben Mal an sieben nicht konsekutiven Tagen gefärbt und von einem Untersucher an jedem Studienort ausgewertet. 314 Schnitte wurden gefärbt und in der statistischen Analyse berücksichtigt. Die Daten wurden mit einer Box-Cox-Transformation analysiert und die Varianzkomponenten wurden berechnet. Der Gesamt-Variationskoeffizient auf Basis der oberen 95%-Konfidenzgrenze betrug 24%. Die Varianz des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses nach Tag und Studienort wird in Abbildung 9 gezeigt.

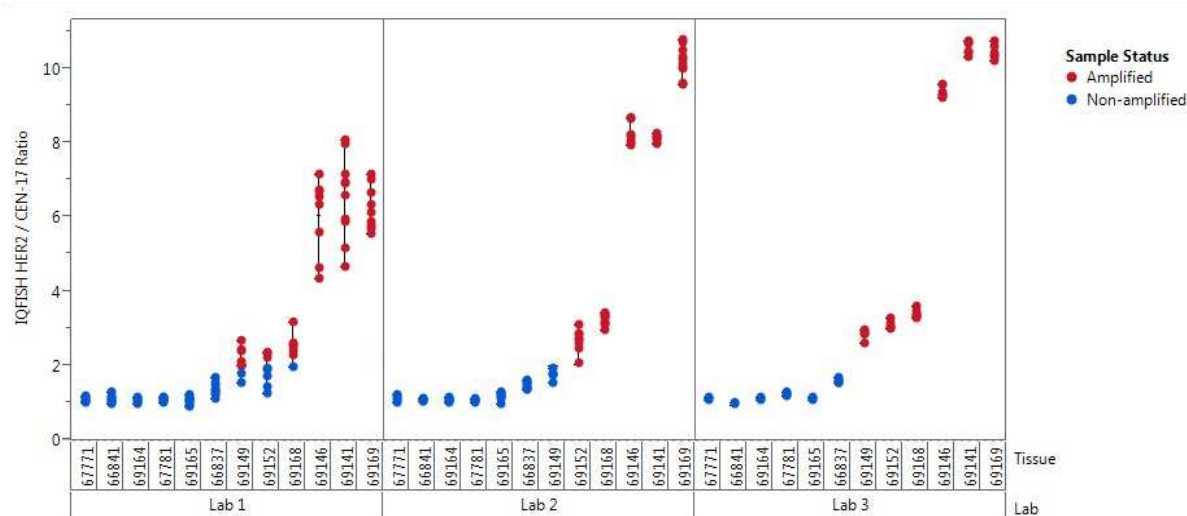


Abb. 9. Variationsdiagramm der *HER2*/CEN-17-Verhältnisse in nicht transformierten Einheiten aus der Studie zu Tag-zu-Tag- und Studienort-zu-Studienort-Reproduzierbarkeit für *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) an Magenkrebsgewebeproben.

Der *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Assay wurde als Teil der intern durchgeführten Methodenvergleichsstudie mit drei Untersuchern, die die gefärbten Proben unabhängig voneinander auswerteten, auf Untersucher-zu-Untersucher-Reproduzierbarkeit getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde an 139 verschiedenen Proben gastrischer Adenokarzinome entweder mit amplifiziertem oder nicht amplifiziertem *HER2*-Gen getestet. Die Daten wurden mit der Box-Cox-Transformation analysiert. Der durchschnittliche Variationskoeffizient zwischen den Untersuchern lag bei 18%. Die Proben der gastrischen Adenokarzinome stammten zu 96,4% aus Resektionen und zu 5,6% aus Biopsien. 81,3% der Proben wurden aus dem Magen und 18,7% aus dem gastroösophagealen Übergang entnommen.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) innerhalb des Labors wurde mit konsekutiven Schnitten von acht Proben aus gastrischen Adenokarzinomen mit entweder amplifiziertem oder nicht amplifiziertem *HER2*-Gen getestet. Die Gewebe wurden an fünf nicht konsekutiven Tagen mit drei verschiedenen Chargen an insgesamt 240 Objektträgern (120 Schnitte mit Duplikat) doppelt getestet. Aus der Datenanalyse mit dem Random-Effects-Modell ergaben sich Unterschiede, die auf Tage und Chargen zurückzuführen waren (siehe interne Studie zur Reproduzierbarkeit). Die übrigen Unterschiede erklären die Varianz zwischen Wiederholungen und damit die Wiederholbarkeit. Die obere 95%-Konfidenzgrenze für den Variationskoeffizient der Reproduzierbarkeit betrug 7,1%.

Methoden-Vergleichsstudie

Vergleich von *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731)

Die Studie umfasste 140 Magenkrebsproben, die sich aus den verschiedenen gastrischen Adenokarzinomtypen, z. B. aus dem Magen oder dem gastroösophagealen Übergang, und Resektionen oder Biopsien mit homogener oder heterogener (fokaler oder mosaikartiger) Signalverteilung zusammensetzen, wie in Tabelle 13 gezeigt.

Magenkrebs

Tabelle 13. Verteilung der Proben nach Magenkrebstyp (Magen oder ÖG. Übergang), Kategorie der Signalverteilung (homogen oder heterogen) und Gewebetyp (Resektion oder Biopsie).

Magenkrebstyp	Anzahl der Proben	Signalverteilung	Anzahl der Proben	Gewebetyp	Anzahl der Proben
Magen	113	Homogen	58	Resektion	134
Gastroösophagealer Übergang	27	Heterogen – fokal	61	Biopsie	6
		Heterogen – mosaikartig	21		
Gesamt	140	Gesamt	140	Gesamt	140

Die Proben umfassten 76 Fälle mit nicht amplifiziertem *HER2* und 64 Fälle mit amplifiziertem *HER2* mit bekanntem HercepTest™-Score wie in Tabelle Table 14 gezeigt.

Tabelle 14. Verteilung der Proben auf Basis des HercepTest™-Scores und des *HER2* FISH-Scores, die mit dem *HER2* FISH pharmDx™ Kit (K5731) erzielt wurden.

HercepTest™ Intensitäts-Score	0	1+	2+	3+	Gesamt
n	39	14	45	42	140
<i>HER2</i> FISH Status					
Amplifiziert	4	1	19	40	64
Nicht amplifiziert	35	13	26	2	76
Gesamtzahl FISH-getestete Proben	39	14	45	42	140

Die Ergebnisse der Kreuztabulierung des *HER2*-Status aus den zwei Assays mit Berechnung der prozentualen Gesamtübereinstimmung (overall percent agreement, OPA), der prozentualen Positivübereinstimmung (positive percent agreement, PPA) und der prozentualen Negativübereinstimmung (negative percent agreement, NPA) werden in Table 15 gezeigt. Die Korrelation zwischen den *HER2*/CEN-17-Verhältnissen anhand der zwei Assays wird in Abbildung 10 gezeigt.

Tabelle 15. Kreuztabulierung des *HER2*-Genstatus, der mit *HER2* IQFISH pharmDx™ (K5731) und *HER2* IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) bestimmt wurde.

		<i>HER2</i>-Genstatus (K5731)		Gesamt
		Nicht amplifiziert	Amplifiziert	
<i>HER2</i>-Genstatus (Dako Omnis)	Nicht amplifiziert	76	1	77
	Amplifiziert	0	63	63
Gesamt		76	64	140
OPA: 99,3%				
PPA: 98,4%				
NPA: 100%				

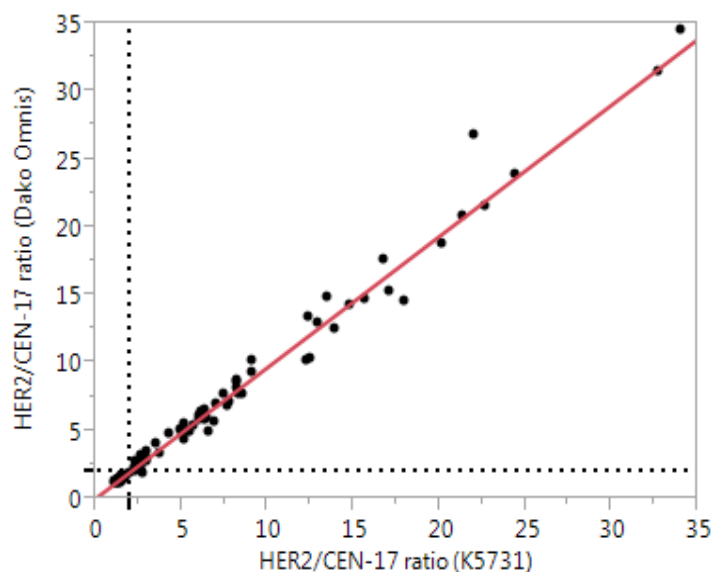


Abb. 10. Korrelation zwischen den HER2/CEN-17-Verhältnissen aus *HER2* FISH pharmDx™ (Dako Omnis) und *HER2* IQFISH pharmDx™ (Code K5731) aus 140 Magenkrebsproben (linearer Ausgleich: $y = 0,06 + 0,97 \cdot x$; $R^2 = 0,97$. Gewichtet mit der Umkehrvarianz, um einen linearen Ausgleich zu ermöglichen).

Das 95%-Konfidenzintervall für die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden Färbemethoden bei *HER2*/CEN-17-Verhältnis = 2 ergab [0,007; 0,022]. Das bedeutet, eine Differenz von über 2% wird nicht erwartet.

Klinische Daten

Die klinische Sicherheit und Wirksamkeit von Trastuzumab (Herceptin™) hat sich in der BO18255-Studie (der ToGA-Studie: "Eine randomisierte, multizentrische Open-Label-Studie der Phase III über Trastuzumab in Kombination mit Cisplatin und einem Fluoropyrimidin (Capecitabin oder 5-Fluorouracil) (FC+H) versus Chemotherapie (FC) alleine als Erstlinientherapie bei Patienten mit HER2-positivem fortgeschrittenem Magenkrebs") erwiesen(28). Die Studie wurde als randomisierte multizentrische Open Label-Studie der Phase III an HER2-positiven Patienten mit fortgeschrittenem gastrischen oder gastroösophagealem Adenokarzinom durchgeführt. In der BO18255-Studie war die HER2-Positivität als entweder IHC-Positivität (3+) im HercepTest™ (Dako) und/oder Positivität im FISH(*HER2*/CEN-17 $\geq 2,0$) mit dem *HER2* FISH pharmDx™ Kit (Dako) definiert. Nachdem die Patienten in die Studie aufgenommen waren, wurde per Zufallsprinzip bestimmt, welche Patienten Chemotherapie (5-FU oder Capecitabin und Cisplatin) und welche Chemotherapie plus Trastuzumab erhielten.

Das Hauptmaß für die Wirksamkeit war das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS), analysiert durch einen stratifizierten Log-Rank-Test. Die endgültige OS-Analyse auf der Basis von 351 Todesfällen war statistisch signifikant (nominales Signifikanzniveau 0,0193). Ein Jahr nach der endgültigen Analyse wurde auch eine aktualisierte OS-Analyse durchgeführt. Das mittlere Gesamt-Überleben von 13,5 Monaten unter Herceptin™ plus Chemotherapie war signifikant länger im Vergleich zum mittleren Gesamt-Überleben von 11,0 Monaten unter Chemotherapie alleine. Die Wirksamkeitsergebnisse aus der endgültigen und der aktualisierten Analyse werden in Tabelle 16 und Abbildung 11 zusammengefasst.

Tabelle 16. Gesamt-Überleben in der Intention-to-Treat (ITT)-Population.

	FC-Arm N = 296	FC + H-Arm N = 298
Endgültiges Gesamt-Überleben		
Anzahl der Todesfälle (%)	184 (62,2%)	167 (56,0%)
Mittelwert	11,0	13,5
95%- KI (mos.)	(9,4, 12,5)	(11,7, 15,7)
Hazard-Ratio	0,73	
95%-KI	(0,60, 0,91)	
p-Wert*, zweiseitig	0,0038*	
Aktualisiertes Gesamt-Überleben		
Anzahl der Todesfälle (%)	227 (76,7%)	221 (74,2%)
Mittelwert	11,7	13,1
95%- KI (mos.)	(10,3, 13,0)	(11,9, 15,1)
Hazard-Ratio	0,80	
95%-KI	(0,67, 0,97)	

*Im Vergleich zum nominalen Signifikanzniveau von 0,0193

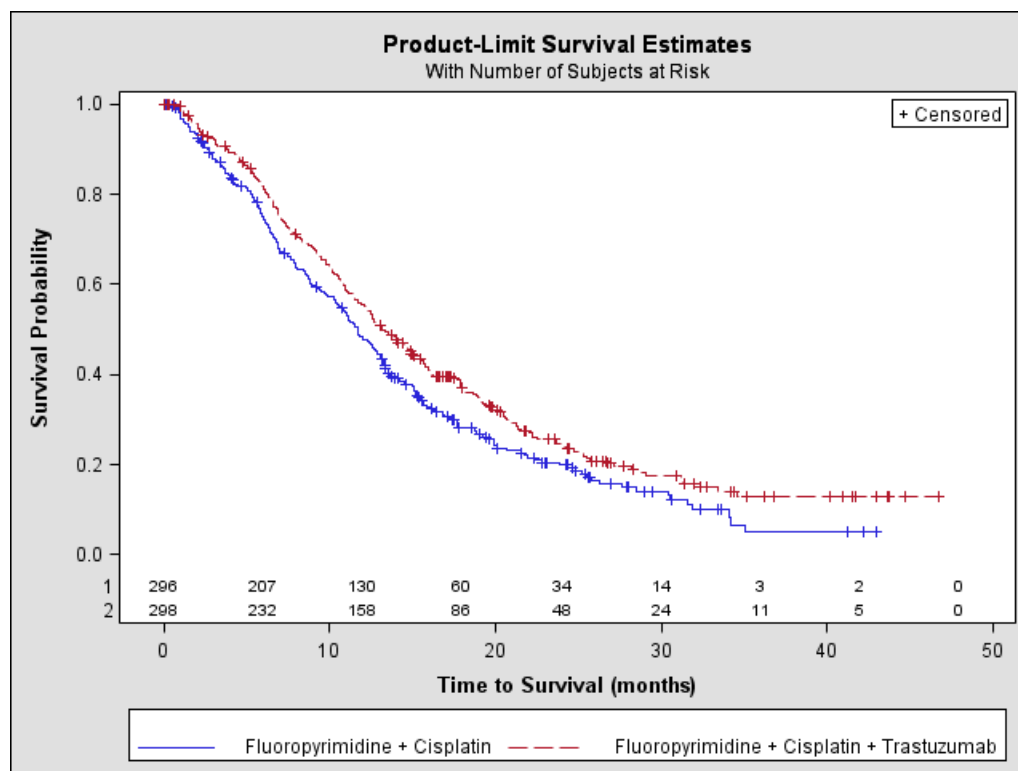


Abb. 11. Aktualisiertes Gesamt-Überleben bei Patienten mit metastasiertem Magenkrebs

Eine diagnostische Analyse des OS auf Basis der Genamplifikations- (FISH) und Protein-Überexpressionstests (IHC) wird in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17. Diagnostische Analysen nach HER2-Status mit den Ergebnissen des aktualisierten Gesamt-Überlebens

	FC N = 296^a	FC+H N = 298^b
FISH+ / IHC 0, 1+ Subgruppe (N = 133)		
Anzahl der Todesfälle / n (%)	57/71 (80,3%)	56/62 (90,3%)
Mittlere OS-Dauer (mos.)	8,8	8,3
95%-KI (mos.)	(6,4, 11,7)	(6,2, 10,7)
Hazard-Ratio (95%-KI)	1,33 (0,92, 1,92)	
FISH+ / IHC 2+ Subgruppe (N = 160)		
Anzahl der Todesfälle / n (%)	65/80 (81%)	64/80 (80%)
Mittlere OS-Dauer (mos.)	10,8	12,3
95%-KI (mos.)	(6,8, 12,8)	(9,5, 15,7)
Hazard-Ratio (95%-KI)	0,78 (0,55, 1,10)	
FISH+ oder FISH-/IHC3+^c Subgruppe (N = 294)		
Anzahl der Todesfälle / n (%)	104/143 (73%)	96/151 (64%)
Mittlere OS-Dauer (mos.)	13,2	18,0
95%-KI (mos.)	(11,5, 15,2)	(15,5, 21,2)
Hazard-Ratio (95%-KI)	0,66 (0,5, 0,87)	

Das mittlere Überleben wurde anhand von Kaplan-Meier-Kurven geschätzt.

^a Zwei FISH+-Patienten des FC-Arms mit unbekanntem IHC-Status wurden von den Analysen ausgeschlossen.

^b Fünf FISH+-Patienten des Herceptin™-Arms mit unbekanntem IHC-Status wurden von den Analysen ausgeschlossen.

^c Schließt sechs Patienten des Chemotherapie-Arms und zehn Patienten des Herceptin™-Arms mit FISH- und IHC3+ sowie acht IHC3+ Patienten des Chemotherapie-Arms und acht IHC3+ Patienten des Herceptin™-Arms mit unbekanntem FISH-Status mit ein.

Fehlerbehandlung – Magenkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
1. Keine Signale oder schwache Signale	<p>1a. Reagenzien wurden während Transport oder Lagerung hohen Temperaturen ausgesetzt.</p> <p>1b. Funktionsstörung des Mikroskops</p> <ul style="list-style-type: none"> - Unangemessener Filtersatz - Falsche Lampe - Quecksilberdampf Lampe zu alt - Verschmutzte und/oder gesprungene Sammellinsen - Ungeeignetes Immersionsöl <p>1c. Abgeschwächte Signale</p> <p>1d. Puffer werden falsch erkannt</p>	<p>1a. Lagerungsbedingungen überprüfen. Bei Entgegennahme der IQISH-Sondenmix- und Pepsinlieferungen muss Trockeneis vorhanden gewesen sein. Überprüfen, ob die Reagenzien gemäß Angaben aufbewahrt wurden.</p> <p>1b. Mikroskop überprüfen und gewährleisten, dass die genutzten Filter für Sondenmix-Fluorochrome geeignet sind und dass die Quecksilberdampf Lampe angemessen ist und ihre Nutzungszeit nicht überschritten wurde (siehe Anhang 5). Im Zweifelsfall Kontakt mit dem Mikroskop-Lieferanten aufnehmen.</p> <p>1c. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und starken Lichteinfall auf einem Minimum halten.</p> <p>1d. Waschpuffer austauschen und korrekte Registrierung (auf der Workstation) und Erkennung der Waschpuffer (auf dem Touchscreen) überprüfen. Weitere Einzelheiten siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis. Hinweis: ISH Pre-Treatment Solution ist grün und ISH Stringent Wash Buffer ist gelb.</p>
2. Bereiche ohne Signal	2. Lufteinschlüsse während des Eindeckens	2. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Falls doch Luftblasen auftreten, vorsichtig mit einer Pinzette abklopfen.
3. Übermäßige Hintergrundanfärbung	3a. Falsche Gewebefixierung	3a Nur formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte verwenden.

Magenkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	3b. Hybridisierter Schnitt war zu lange hellem Licht ausgesetzt.	3b. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung zu starkem Licht auf einem Minimum halten.
4. Schlechte Gewebemorphologie	4a. Falsche Pepsin-Behandlung	4a. Zu einem anderen der drei unterschiedlichen Färbeprotokolle wechseln. ISH Pepsin muss bei korrekter Temperatur aufbewahrt werden.
	4b. Zu lange Pepsin-Behandlung oder sehr dünne Schnitte können zum Auftreten von Schatten- oder bikonkaven "Doughnut"-Zellen führen	4b. Erneut versuchen mit einem Färbeprotokoll mit kürzerer Pepsininkubationszeit. Die Schnittdicke muss 3-6 µm betragen.
5. Ausgeprägte grüne Auto-Fluoreszenz auf Objektträger, auch in Bereichen ohne FFPE-Gewebe	5. Es wurden verfallene oder nicht empfohlene Glasobjektträger angewendet.	5. Nur spezifizierte Glasobjektträger verwenden. Auf das Verfallsdatum der Glasobjektträger achten.

HINWEIS: Falls das Problem keiner der oben genannten Ursachen zugewiesen werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Anhang 3 – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis), Code GM333

Bewertungsschema

Datum des Durchlaufs: _____ Logbuch-ID des Färbedurchlaufs: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Charge: _____ Proben-ID: _____

Charakterisierung der Signalverteilung im Gewebe:

Homogen:

Heterogen – fokal: oder Heterogen – mosaikartig:

Signale von 20 Zellkernen auszählen					
Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)	Zellkern Nr.	HER2-Score (rot)	CEN-17-Score (grün)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Gesamt (1-10)			Gesamt (11-20)		

Zum Ermitteln des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses wird bei denselben 20 Zellkernen die Anzahl der *HER2*-Signale und die Anzahl der *CEN-17*-Signale gezählt, woraufhin dann die Gesamtzahl der *HER2*-Signale durch die Gesamtzahl der *CEN-17*-Signale dividiert wird. Liegt das *HER2/CEN-17*-Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8-2,2), sind 40 weitere Zellkerne auszuzählen und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen erneut berechnet (siehe Bewertungsschema für Neuauszählung, Anhang 4).

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Werts (1,8-2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren (siehe Leitfaden für die Signalzählung).

	<i>HER2</i>	<i>CEN-17</i>	<i>HER2/CEN-17-Verhältnis</i>
Gesamtwert (1-20)			

- Verhältnis < 2: *HER2*-Genamplifikation wurde nicht beobachtet
- Verhältnis ≥ 2: *HER2*-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in: _____

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin: _____

Hinweise zur Bewertung siehe Interpretation des Anfärbens.

Anhang 4 – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™, Code GM333

Bewertungsschema für Neuauszählung

Datum des Durchlaufs: _____ Logbuch-ID des Färbedurchlaufs: _____

HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako Omnis) Charge: _____ Proben-ID: _____

Signale in weiteren 40 Zellkernen (1-40)											
Zellkern Nr.	HER2 (rot)	CEN-17 (grün)	Zellkern Nr.	HER2 (rot)	CEN-17 (grün)	Zellkern Nr.	HER2 (rot)	CEN-17 (grün)	Zellkern Nr.	HER2 (rot)	CEN-17 (grün)
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Gesamt (1-10)			Gesamt (11-20)			Gesamt (21-30)			Gesamt (31-40)		

Zum Ermitteln des HER2/CEN-17-Verhältnisses wird bei denselben 40 Zellkernen die Anzahl der HER2-Signale und die Anzahl der CEN-17-Signale gezählt, woraufhin dann die Gesamtzahl der HER2-Signale durch die Gesamtzahl der CEN-17-Signale dividiert wird. **Gesamtbewertung der Zellkerne 1-40 in der Tabelle weiter unten angeben.**

	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17-Verhältnis
Gesamtwert (1-40)			

- Verhältnis < 2: HER2-Genamplifikation wurde nicht beobachtet
 Verhältnis ≥ 2: HER2-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in:

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin:

Hinweise zur Bewertung siehe Interpretation des Anfärbens.

Anhang 5 – Magenkrebs

HER2 IQFISH pharmDx™, Code GM333

Spezifikationen des Fluoreszenz-Mikroskops

Dako empfiehlt folgende Ausstattung zur Anwendung mit HER2 IQFISH pharmDx™, (Dako Omnis), GM333:

1. Mikroskop – Ausführung

- Epifluoreszenz-Mikroskop

2. Lampe

- Quecksilberdampflampe, 100 Watt (es sind Aufzeichnungen über die Einschaltzeit zu führen)

3. Objektive

- Für das Screening des Gewebes sind Ölimmersionsobjektive 16x oder 20x zu verwenden.
- Für hochauflösende Vergrößerung und für die Signalauszahlung der Signale werden nur Ölimmersionsobjektive, z.B. 100x, empfohlen.

4. Filter

Filter werden jeweils für spezifische Fluorochrome konzipiert und müssen entsprechend ausgewählt werden. Dako empfiehlt die Verwendung eines spezifischen DAPI-Filters in Kombination mit einem qualitativ hochwertigen Texas Red-/FITC-Doppelfilter.

- DAPI-Filter, z.B. "Chroma"-Filter Nr. 31000
- Texas Red-/FITC-Doppelfilter, z.B. Filter Nr. XF53 von Omega Optical oder Chroma-Filter Nr. 51006
- Texas Red- und FITC-Einzelfilter können für die Bestätigung und Auszählung genutzt werden.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filter sind für jeden Mikroskoptyp spezifisch und für die Interpretation ist die Nutzung der jeweils angemessenen Filter unerlässlich. Ausführlichere Informationen können vom Hersteller des Mikroskops oder vom zuständigen Dako-Repräsentanten eingeholt werden.

5. Öl

- Nicht fluoreszierendes Öl

Vorsichtsmaßnahmen

- Eine Quecksilberdampflampe von 50 Watt wird nicht empfohlen.
- Rhodamin-Filter können nicht verwendet werden.
- Dreifachfilter werden nicht empfohlen.

Ein nicht optimiertes Mikroskop kann Probleme beim Lesen der Fluoreszenzsignale verursachen. Es ist wichtig, dass die Lichtquelle nicht ihren Nutzbarkeitszeitraum überschritten hat und korrekt ausgerichtet und fokussiert wurde.

Hinsichtlich der Quecksilberdampflampe ist die Leistungsüberprüfung nach den Herstelleranleitungen durchzuführen. Vor einer Interpretation der Ergebnisse muss das Mikroskop gewartet und die korrekte Ausrichtung der Quecksilberdampflampe sichergestellt werden.

Damit eine Abschwächung der Fluoreszenz vermieden wird, ist sicherzustellen, dass die Probe so wenig Anregungslicht wie möglich ausgesetzt wird.










Vor dem ersten Durchführen der FISH-Technik wird empfohlen, das Einrichten des im Labor genutzten Mikroskops mit dem Hersteller zu diskutieren oder auf die Literatur Bezug zu nehmen.

References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

1. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230:1132-9.
2. Muleris M, Almeida A, Malfoy B, Dutrillaux B. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17q21.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;76:34-5.
3. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5321-5.
4. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229:974-6.
5. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30:41-8.
6. Rennstam K, Baldetorp B, Kytola S, Tanner M, Isola J. Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res*. 2001;61:1214-9.
7. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:319-25.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50:4332-7.
10. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14: 320-368.
11. Nichols DW, Wolff DJ, Self S, Metcalf JS, Jacobs D, Kneuper-Hall R, et al. A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann Clin Lab Sci*. 2002;32:3-11.
12. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-82.
13. Nielsen PE, Egholm M, editors. *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*. Norfolk NR18 0EH, England: Horizon Scientific Press. 1999.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document M29-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
15. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, FR 7163, February 28. 1992.
16. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*. St. Louis: CV Mosby Company. 1980.
17. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. New York: Pergamon Press. 1981.

18. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer*. 2001;92:2965-74.
19. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*. 2000;53:890-2.
20. Hanna W. Testing for HER2 status. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:22-30.
21. Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Penault-Llorca F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, et al. Comparative multi-methodological measurement of ERBB2 status in breast cancer. *J Pathol*. 2004;202(3):286-98.
22. Olsen KE, Knudsen H, Rasmussen BB, Baslev E, Knoop A, Ejlersen B, et al. Amplification of HER2 and TOP2A and deletion of TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes. *Acta Oncol*. 2004;59:795-805.
23. Jorgensen JT. Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology*. 2010;78:26-33.
24. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59:795-805.
25. Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, et al. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol*. 2008;32:89-95.
26. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol*. 2005;27:681-5.
27. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*. 2005;16:273-8.
28. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9742):687-97.
29. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de 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.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

 <p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Use by Utiliser avant Verwendbar bis</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Keep away from sunlight (consult storage section) Conserver à l'abri de la lumière (Voir la section Conservation) Vor Sonnenlicht schützen (siehe Abschnitt Aufbewahrung)</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>GHS pictogram (consult precautions section) Pictogramme SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Piktogramm (siehe Abschnitt mit Vorsichtsmaßnahmen)</p>

Manufactured by/ Fabriqué par /
Hergestellt von:

Dako Denmark A/S

Produktionsvej 42

DK-2600 Glostrup

Denmark/ Danemark/ Dänemark

Tel. +45 44 85 95 00

Fax +45 44 85 95 95

www.Dako.com

Distributed in the US by/ Distribué aux États-Unis par /
Vertrieb in den USA:

Dako North America Inc.

6392 Via Real

Carpinteria, CA 93013, USA

Tel. 805/566-6655,

Toll Free/ Appel gratuit/ Gebührenfrei:

800/235-5743

Ordering Information/ Information relatives aux
commandes/ Bestellinformationen:

Tel. 800/235-5763

Fax 805/566-6688

Technical Services/ Services techniques/

Technischer Kundendienst: Tel. 800/424-0021