

## Bezeichnung des Produktes

Kat. Nr. Beschreibung  
47862 ImPath HER2 FISH

## Verwendungszweck

ImPath HER2 FISH (Kat. Nr. 47862) ist für die Verwendung in Kombination mit dem „ImPath ISH Detection Kit“ (Kat. Nr. 44996) für den Nachweis des menschlichen ERBB2-Gens (auch bekannt als HER2) bzw. der Alpha-Satelliten von Chromosom 17 in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe oder in Zellproben durch Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) auf dem ImPath 36 (Kat. Nr. 43965) vorgesehen.

Die Auswertung der Ergebnisse muss auf Grundlage der Krankengeschichte des Patienten mit Bezug auf weitere klinische und pathologische Daten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

## Zusammenfassung und Erklärung

Das ERBB2-Gen (auch bekannt als HER2 und NEU) befindet sich in der Chromosomenregion 17q12 und kodiert den Zellwachstumsfaktor-Rezeptor p185. Eine Amplifikation des Proto-Onkogens ERBB2, die bei ca. 20% aller Brustkrebsproben nachzuweisen ist, korreliert mit einer schlechten Krankheitsprognose. Ähnliche Resultate wurden für eine Vielzahl von anderen malignen Tumoren z. B. Eierstockkrebs, Magenkrebs und Karzinomen der Speicheldrüse erzielt.

## Prinzipien und Verfahren

Das Vorhandensein von bestimmten Nucleinsäure-Sequenzen in Zellen oder Geweben kann durch Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) mithilfe von DNA-Sonden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, nachgewiesen werden. Die Hybridisierung resultiert in Duplexbildung der im Versuchsobjekt vorhandenen Sequenzen und der speziellen Sonde, die mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie bei Verwendung der geeigneten Filter angezeigt werden können.

ImPath HER2 FISH enthält orange markierte Polynukleotide (Absorption bei 547 nm und Emission bei 572 nm, ähnlich wie Rhodamin), welche auf das ERBB2-Gen abzielen, bzw. grün markierte Polynukleotide (Absorption bei 503 nm und Emission bei 528 nm, ähnlich wie FITC), die an Alpha-Satelliten-Sequenzen des Zentromers von Chromosom 17 (D17Z1) binden.

## Materialien und Methoden

### Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Beim angegebenen Produkt handelt es sich um eine gebrauchsfertige FISH-Sonde in einem speziellen Gefäß für die Verwendung mit dem ImPath 36. Das Gefäß verfügt über eine RFID-Kennzeichnung, die vom ImPath 36 gelesen wird, um spezifische Informationen zu Produkt und Charge zu erhalten.

### Rekonstituieren, Mischen, Verdünnen

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Es ist keine Rekonstitution, Mischung oder Verdünnung erforderlich.

Unterschiede bei der Gewebeerarbeitung und bei technischen Verfahren im Labor können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen, weswegen die regelmäßige Verwendung von Kontrollen erforderlich ist. (Siehe Abschnitt Qualitätskontrollverfahren)



42 life sciences GmbH & Co. KG  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven  
Deutschland

29. März 2016  
DE REV 1.2

Vertrieb:

A. Menarini Diagnostics S.r.l.  
Via Sette Santi, 3  
50131 Florenz  
Italien



**In-vitro-Diagnostikum**  
gemäß EU-Richtlinie 98/79/EG

## Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien und Reagenzien

Die folgenden Reagenzien und Materialien sind gegebenenfalls für das Färbeverfahren erforderlich, aber nicht im Lieferumfang der FISH-Sonde enthalten.

1. Positives und negatives Kontrollgewebe
2. Mikroskop-Objektträger, positiv geladen
3. Trocknungsofen, der eine Temperatur von 50-60 °C aufrechterhalten kann
4. Färbebehälter oder Färbebäder
5. Stoppuhr
6. Ethanol oder vergällter Alkohol
7. ImPath ISH Detection Kit (Kat. Nr. 44996)
8. DAPI/Antifade-Lösung\*
9. Deckgläschen
10. Fluoreszenz-Mikroskop (400-1000x)
11. Geeignete Filtersätze

\*Empfohlen: ImPath DAPI (Kat. Nr. 47861)

## Lagerung und Handhabung

Bei 2-8 °C in senkrechter Position lagern. Lichtgeschützt lagern.

Vor dem Öffnen, die Flüssigkeit herunterschütteln.

Um eine ordnungsgemäße Reagenzabgabe und die Sondenstabilität zu gewährleisten, muss das Reagenz unmittelbar nach Gebrauch unter den oben genannten Lagerungsbedingungen gelagert werden.

Bei ordnungsgemäßer Lagerung bleibt das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Verwenden Sie keine Reagenzien über das für die vorgeschriebene Lagerungsmethode angegebene Ablaufdatum hinaus.

## Probenentnahme und Vorbereitung für die Analyse

Routinemäßig verarbeitete, neutral-gepufferte formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebe eignen sich für die Verwendung mit dieser FISH-Sonde. Empfohlenes Gewebefixiermittel ist 10 % neutralgepuffertes Formalin.

Jeder Gewebeschnitt sollte auf die geeignete Dicke zurechtgeschnitten (ca. 3-5 µm) und auf einen positiv geladenen Glas-Objektträger platziert werden. Objektträger, die den Gewebeschnitt enthalten, sollten mindestens 2 Stunden lang (aber nicht mehr als 16 Stunden) in einem Ofen bei 50-60 °C gebacken werden.

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Beim Umgang mit Reagenzien geeignete Vorsichtsmaßnahmen ergreifen. Beim Umgang mit vermutlich krebserregenden oder giftigen Materialien Einweghandschuhe verwenden.
2. Kontakt von Reagenzien mit den Augen und Schleimhäuten vermeiden. Falls die Reagenzien in Kontakt mit sensiblen Bereichen geraten, mit reichlich Wasser abwaschen.
3. Gewebe und Zellproben sowie alle Materialien, die diese enthalten, sollten als biologisch gefährliche Materialien behandelt und unter Anwendung der adäquaten Sicherheitsmaßnahmen entsorgt werden. Niemals mit dem Mund pipettieren.
4. Mikrobielle Kontaminationen von Reagenzien vermeiden, da dies zu unkorrekten Ergebnissen führen könnte.
5. Der Benutzer ist für die Optimierung der Pepsin-Inkubationszeiten- und -temperaturen verantwortlich.

6. Das vorverdünnte und gebrauchsfertige Reagenz ist optimal verdünnt. Jede weitere Verdünnung kann zu einer Beeinträchtigung der Färbequalität führen.
7. Dieses Produkt ist als gefährliche Substanz klassifiziert. Für weitere Details siehe entsprechendes Materialsicherheitsdatenblatt.
8. Der Benutzer ist verpflichtet Lagerungsbedingungen, die von den in der Packungsbeilage angegebenen abweichen, zu überprüfen und zu validieren.
9. Wie bei allen aus biologischen Quellen stammenden Produkten sollten immer geeignete Handhabungsverfahren angewendet werden.

## **Bedienungsanleitung**

ImPath HER2 FISH (Kat. Nr. 47862) ist für die Verwendung in Kombination mit dem „ImPath ISH Detection Kit“ (Kat. Nr. 44996) auf dem ImPath 36 (Kat. Nr. 43965) vorgesehen.

## **ImPath ISH-Protokoll:**

„ImPath ISH Detection Kit“ (Kat. Nr. 44996)

## **Protokollschritte**

### **Schrittweise Vorgehensweise**

1. Befolgen Sie die Gebrauchsanleitung des ImPath 36, um die Einstellung auf dem Gerät für das verwendende Reagenz vorzunehmen.
2. Bestücken Sie den ImPath 36 mit den Objektträgern, der FISH-Sonde und dem „ImPath ISH Detection Kit“ gemäß den ImPath 36-Gebrauchsanweisungen.

**Die Pepsin-Verdauungszeit gemäß den zuvor vom Benutzer validierten Bedingungen einstellen.**

3. Lauf starten.
4. Nach Beendigung des Färbungslaufes entfernen Sie die Objektträger aus dem Gerät und dehydrieren Sie mit 70 %, 90 % und 100 % Ethanol für je 1 min.
5. Proben im Dunkeln lufttrocknen lassen.
6. Mit einer DAPI/Antifade-Lösung eindecken (es wird die Verwendung von ImPath DAPI (Kat. Nr. 47861) empfohlen) und im Dunkeln 15 Minuten lang inkubieren lassen.
7. Mit Deckglas abdecken und die Objektträger im Dunkeln bei 2-8 °C lagern.

## **Qualitätskontrollverfahren**

### **Positive Gewebekontrolle**

Mit jedem ausgeführten Färbeverfahren muss eine positive Gewebekontrolle mitgeführt werden. Dieses Gewebe kann sowohl amplifizierte (positive) und nicht-amplifizierte (negative) gefärbte Zellen enthalten und dient sowohl als positives als auch als negatives Kontrollgewebe.

Bekannt positive Gewebekontrollen sollten zur Überwachung der ordnungsgemäßen Leistung des benutzten Gewebes und der Testreagenzien verwendet werden, und nicht als Hilfe bei der Erstellung einer spezifischen Diagnose für Patientenproben. Falls mit den positiven Gewebekontrollen eine adäquate positive Färbung nicht nachgewiesen werden kann, müssen die Resultate mit diesen Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

## Negative Gewebekontrolle

Für die negative Gewebekontrolle kann das selbe Gewebe wie für die positive Gewebekontrolle verwendet werden.

Nicht-neoplastische Zellen auf dem Objektträger/im Tumorabschnitt wie z. B. Fibroblasten, Epithelzellen und/oder Lymphozyten dienen als interne Kontrolle, müssen das erwartete normale Signalmuster aufweisen und können daher als negative Gewebekontrolle dienen. Falls mit diesen Zellen eine adäquate Färbung nicht nachgewiesen werden kann, müssen die Resultate mit den entsprechenden Proben als ungültig betrachtet werden.

## Erklärungsbedürftige Unstimmigkeiten und Abweichungen

Über erklärungsbedürftige Unstimmigkeiten und Abweichungen muss A. Menarini Diagnostics unverzüglich in Kenntnis gesetzt werden. Falls die Ergebnisse der Qualitätskontrolle nicht den Spezifikationen entsprechen, gelten die Patientenergebnisse als ungültig. Siehe Abschnitt „Troubleshooting“ in dieser Gebrauchsanleitung. Identifizieren und beheben Sie das Problem und wiederholen Sie dann das gesamte Verfahren mit den Patientenproben.

## Auswertung der Ergebnisse

Bei Verwendung der geeigneten Filter-Einstellungen, erscheinen die Hybridisierungssignale von markierten ERBB2-Genen orange und die Hybridisierungssignale von markierten Alpha-Satelliten-Sequenzen des Zentromers von Chromosom 17 grün. In Interphasen von normalen Zellen oder in Zellen ohne Veränderungen des Chromosoms 17 erscheinen zwei ERBB2-Signale und zwei Chromosom-17-Signale. In Zellen mit einer Genamplifikation ist eine erhöhte Anzahl von genspezifischen Signalen oder Signal-Clustern sichtbar.

Es sollte darauf geachtet werden keine überlappenden Zellen zu evaluieren, um falsche Ergebnisse, z. B. eine Amplifikation von Genen zu vermeiden. Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale derselben Größe, die durch eine Distanz getrennt sind, die dem Durchmesser eines Signals entspricht bzw. niedriger als dieser ist, als ein Signal gezählt werden.

Gewebeartefakte wie Grenzflächengewebe oder zerrissene bzw. gequetschte Gewebe sollten von der Evaluierung ausgeschlossen werden. Werten Sie kein Patientengewebe aus, falls die Kontrollen nicht den Erwartungen entsprechen. Verwerfen Sie das Objekt, falls dieses eine starke Autofluoreszenz aufweist. Ein Überverdau kann anhand von dunklen Bereichen erkannt werden, die innerhalb der Zellkerne sichtbar sind. Diese sollten von der Evaluierung ausgeschlossen werden.

Ein negatives oder unspezifisches Resultat kann durch mehrere Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel „Troubleshooting“ in dieser Beilage).

## Verwendungsbeschränkungen

1. Dieses Reagenz ist nur für den „Gebrauch durch Fachpersonal“ vorgesehen, da es sich bei der Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung um einen mehrstufigen Prozess handelt, der eine spezialisierte Ausbildung für die Auswahl der geeigneten Reagenzien, Gewebe, Fixierungen, Verfahren und Präparate in Bezug auf den FISH-Objektträger und die Auswertung der Färbresultate erfordert.
2. Nur für die Verwendung im Labor vorgesehen.
3. Nur für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik vorgesehen.
4. Die Färbung des Gewebes, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist von der Handhabung und der Verarbeitung des Gewebes vor dem Färbvorgang abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Aufheizen, Schneiden bzw. eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Messartefakten oder falschen Ergebnissen führen. Inkonsistente oder einander widersprechende Ergebnisse können eine

Folge von Abweichungen oder Änderungen bei den Fixierungs- und Einbettungsverfahren sein bzw. aus Unregelmäßigkeiten, die dem Gewebe selbst eigen sind, resultieren.

5. Durch zu starke oder unvollständige Gegenfärbungen kann die ordnungsgemäße Auswertung der Resultate beeinträchtigt werden.
6. Die Qualität der Signale hängt von der richtigen Positionierung des Gewebes auf der unteren Hälfte des Objektträgers ab. Für weitere Informationen über die ordnungsgemäße Platzierung des Gewebes wenden Sie sich bitte an Ihren Handelsvertreter von A. Menarini Diagnostics.
7. Die klinische Auswertung von etwaigen positiven Anfärbungen bzw. von deren Nichtvorhandensein muss auf Grundlage der Krankengeschichte, der Morphologie sowie anderer histopathologischen Kriterien bzw. anderer Diagnoseverfahren oder Diagnostesttests erfolgen. Zu der Verantwortung von qualifizierten Pathologen gehört es, mit den FISH-Sonden, Reagenzien, Diagnostik-Panels und den Methoden und Verfahren vertraut zu sein, die zur Herstellung des Färbepräparats verwendet werden. Der Färbevorgang muss in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter der Aufsicht eines Pathologen erfolgen, der für die Überprüfung und Bewertung der gefärbten Objektträger und für die Gewährleistung der Eignung von Positiv- und Negativkontrollen verantwortlich ist.
8. Die FISH-Sonden und Reagenzien sind gebrauchsfertig und werden in optimaler Verdünnung für die anweisungsgemäße Verwendung bereitgestellt. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können dazu führen, dass die erwarteten Ergebnisse unbrauchbar werden. Es müssen geeignete Kontrollen verwendet und dokumentiert werden. Die Benutzer sind unter allen Umständen für die Interpretation und Auswertung der Patientenresultate verantwortlich.
9. Reagenzien können unvorhergesehene Reaktionen in zuvor nicht getesteten Geweben zeigen. Die Möglichkeit von unvorhergesehenen Reaktionen auch in getesteten Gewebegruppen kann aufgrund von biologischen Variabilitäten in Tumoren oder anderen pathologischen Geweben nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Wenden Sie sich bei etwaigen vermuteten und dokumentierten unvorhergesehenen Reaktionen an den Kundendienst von A. Menarini Diagnostics.

## Erwartete Ergebnisse

Die folgende Tabelle zeigt die Leistung der ImPath HER2 FISH-Sonde im Vergleich zu einer CE-zertifizierten manuellen HER2 FISH-Sonde auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Mammakarzinomgewebe. Gemäß der ASCO Guideline (2013) ist ein HER2/CEN 17 Ratio  $\geq 2.0$  als positiv zu bewerten.

		ImPath HER2 FISH		
		negativ (HER2/CEN 17 ratio <2.0)	positiv (HER2/CEN 17 ratio $\geq 2.0$ )	Gesamt
Referenz	negativ (HER2/CEN 17 ratio <2.0)	14	0	14
	positiv (HER2/CEN 17 ratio $\geq 2.0$ )	0	5	5
	Gesamt	14	5	19

Für die ImPath HER2 FISH-Sonde ist bei Ausführung im ImPath 36 eine hohe Konkordanz von 100 %, eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 100 % gewährleistet.

## Troubleshooting

1. Falls keine oder nur schwache Signale festgestellt werden, wurde möglicherweise keine ordnungsgemäße proteolytische Vorbehandlung durchgeführt. Die Pepsin-Inkubationszeit sollte optimiert werden.
2. Darüber hinaus kann eine zu geringe Waschpufferkonzentration zu schwachen Signalen führen. Die Konzentration des Waschpuffers sollte regelmäßig überprüft werden.
3. Ein falsch eingestelltes Fluoreszenz-Mikroskop kann eine weitere Ursache für eine schwache Signalintensität sein. Vergewissern Sie sich, dass Sie ein ordnungsgemäß konfiguriertes und gut gewartetes Fluoreszenz-Mikroskop mit geeigneten Filter-Sets verwenden.
4. Zu starke Lichtstrahlen bei der Handhabung von Sonden/Objektträgern können ebenso eine Ursache von fehlenden oder schwachen Signalen sein. Der Umgang mit der Sonde und den gefärbten Objektträgern sollte immer geschützt von direktem Sonnenlicht erfolgen.
5. Falls Kreuzhybridisierungssignale oder starke Hintergrundfärbungen auftreten, war die proteolytische Vorbehandlung möglicherweise zu stark und die Pepsin-Inkubationszeit sollte optimiert werden.
6. Darüber hinaus kann eine zu hohe Waschpufferkonzentration zu einer Kreuzhybridisierung oder zu einer starken Hintergrundfärbung führen. Die Konzentration des Waschpuffers sollte regelmäßig überprüft werden.
7. Falls Gewebeschnitte vom Objektträger abgewaschen werden, sollte überprüft werden, dass dieser positiv geladen ist. Weitere Gegebenheiten, die die Gewebeadhäsion beeinträchtigen können: unzureichende Trocknung des Gewebeschnitts auf dem Objektträger vor dem Färben oder Fixieren in nicht ordnungsgemäß neutral-gepuffertem Formalin. Die Dicke des Gewebes kann ebenso zu einer Beeinträchtigung beitragen.

Für Abhilfemaßnahmen, siehe Abschnitt „Schrittweise-Vorgehensweise“ bzw. wenden Sie sich an den Kundendienst von A.Menarini Diagnostics.

## Literaturhinweise

1. Kievits T, *et al.* Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6. (1990)
2. Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press ISBN 0 19 963327 4. (1992)
3. Wolff AC, *et al.* Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 31(31):3997-4013 (2013)