

Identificatie van de stof of het preparaat

Cat. nr. Beschrijving
47862 ImPath HER2 FISH

Beoogd gebruik

ImPath HER2 FISH probe (cat.nr. 47862) is bestemd voor, in gebruik met combinatie van de ImPath ISH Detection Kit (cat.nr. 44996), de detectie van het humane ERBB2 gen (ook bekend als HER2) en chromosoom 17 centromeer DNA in formaline gefixeerd, paraffine-ingebed weefsel of celmonsters door fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) op de ImPath 36 (cat.nr. 43965). De interpretatie van de resultaten moet uitgevoerd worden binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt met betrekking tot de nadere klinische en pathologische gegevens van de patiënt door een gekwalificeerde patholoog.

Samenvatting en uitleg

Het ERBB2-gen (ook bekend als HER2 / NEU) bevindt zich op de lange arm van chromosoom-17 (17q12) en codeert voor de cellulaire groeifactor receptor p185. Amplificatie van het proto-oncogen ERBB2, waargenomen in ongeveer 20% van alle borstkankermonsters, wordt in verband gebracht met een slechte prognose van de ziekte. Vergelijkbare resultaten werden verkregen voor een verscheidene andere kwaadaardige tumoren, bijvoorbeeld eierstokkanker, maagkanker en carcinomen van de speekselklier.

Beginselen en procedures

De aanwezigheid van bepaalde DNA sequenties in cellen of weefsels kan worden gedetecteerd door middel van fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) met behulp van DNA-probes die gemarkeerd zijn met fluorescerende kleurstoffen. De hybridisatie resulteert in de vorming van dubbele sequenties die in het testobject en de specifieke probe aanwezig zijn en die, met gebruik van passende filters, zichtbaar gemaakt kunnen worden middels fluorescentiemicroscopie.

De ImPath HER2 FISH bevat oranje gemerkte polynucleotiden (excitatie bij 547 nm en emissie bij 572 nm, vergelijkbaar met rhodamine of TRITC), met het ERBB2-gen als doelgen, en groen gelabelde polynucleotiden (excitatie bij 503 nm en emissie bij 528 nm, vergelijkbaar met FITC), met a-satelliet DNA-sequenties van de centromeer van chromosoom 17 (D17Z1) als doelgenen.

Materialen en methoden

Verschaftte reagentia

Het aangegeven product is een gebruiksklare FISH-probe in een flacon die gemaakt is voor gebruik met de ImPath 36. De flacon is uitgerust met een RFID-tag die door de ImPath 36 gelezen wordt om specifieke informatie over het reagens te verschaffen.

Reconstitutie, mengen, verdunnen

Het product is gebruiksklaar. Reconstitutie, mengen of verdunnen is niet nodig. Verschillen in weefselverwerking en technische procedures in het laboratorium kunnen leiden tot een aanzienlijke variabiliteit van de resultaten en vereisen daarom een regelmatig gebruik van controles. (Zie paragraaf Kwaliteitscontroleprocedures)



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

3 november 2015
NL VERSIE 1.2

Gedistribueerd door:
A.Menarini Diagnostics S.r.l.
Via Sette Santi, 3
50131 Florence
Italië



Medisch hulpmiddel voor *in vitro* diagnostiek
volgens EU-richtlijn 98/79/EG

Benodigde maar niet meegeleverde materialen en reagentia

De volgende reagentia en materialen kunnen nodig zijn voor kleuring, maar worden niet met de FISH-probe meegeleverd.

1. Positief en negatief controleweefsel
2. Microscoop objectglaasjes, positief geladen
3. Droogstoof, in staat om een temperatuur van 50-60° C te behouden
4. Kleurbakken of -baden
5. Timer
6. Ethanol of reagens alcohol
7. ImPath ISH Detection Kit (cat. nr. 44996)
8. DAPI/Antifade*
9. Dekglaasje
10. Fluorescentie microscoop (400-1000 x)
11. Passende filtersets

*Aanbevolen gebruik: ImPath DAPI (cat. nr. 47861)

Opslag en hantering

Bewaren bij 2-8°C in een verticale positie. Bewaren beschermd tegen licht. Voorafgaand aan de opening van de flacon, de vloeistof goed schudden en afdraaien. Om te zorgen voor de juiste levering van de reagens en stabiliteit van de FISH-probe moet het reagens onmiddellijk na gebruik weer in de hierboven aangegeven bewaarcondities gebracht worden. Indien op de juiste wijze bewaard, blijft het reagens tot de op het etiket aangegeven datum stabiel. Het reagens voor de voorgeschreven bewaarmethode niet na deze vervaldatum gebruiken.

Monsterafname en voorbereiding op analyse

Routinematig verwerkte, neutraal-gebufferde formalinegefixeerde, paraffine-ingebedde, weefsels zijn geschikt voor gebruik met deze FISH- probe. Het aanbevolen fixeermiddel voor weefsel is 10% neutraal-gebufferde formaline.

Elke coupe moet op de juiste dikte (ongeveer 3-5 µm) gesneden worden en op een positief geladen objectglaasje geplaatst worden. Objectglaasjes met de weefselcoupe kunnen gedurende minstens 2 uur (maar niet langer dan 16 uur) in een oven op 50-60° C verhit worden.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

1. Neem bij het hanteren van reagentia redelijke voorzorgsmaatregelen. Gebruik bij het hanteren van vermoedelijke carcinogenen of giftige stoffen wegwerphandschoenen en een laboratoriumjas.
2. Vermijd contact van reagentia met ogen en slijmvliezen. Als reagentia in contact komen met kwetsbare plaatsen, met een overvloedige hoeveelheid water wassen.
3. Weefsel- en celmonsters en alle materialen die hiermee in contact komen moeten gehanteerd worden als biologisch gevaarlijk materiaal en met de juiste voorzorgsmaatregelen verwijderd worden. Pipetteer nooit via de mond.
4. Vermijd microbiële besmetting van reagentia, omdat dit tot onjuiste resultaten kan leiden.
5. De gebruiker moet de incubatietijden en -temperaturen van de Pepsine-oplossing optimaliseren.
6. Het vooraf verdunde, gebruiksklare reagens is optimaal verdund, en verdere verdunning kan leiden tot kwaliteitsverlies van de kleuring.

7. Dit product is geclassificeerd als een gevaarlijke stof. Raadpleeg het bijbehorende veiligheidsinformatieblad voor meer informatie.
8. De gebruiker dient eventuele andere bewaarcondities dan die in de bijsluiters vermeld zijn te valideren.
9. Net als bij elk product dat verkregen is uit biologische bronnen, moeten de juiste hanteringsprocedures gebruikt worden.

Gebbruiksaanwijzing

De ImPath HER2 FISH (cat. nr 47862) is bestemd voor gebruik in combinatie met de ImPath ISH Detection Kit (cat. nr. 44996) op de ImPath 36 (cat.nr. 43965).

ImPath ISH Protocol:

ImPath ISH Detection Kit (cat.nr.: 44996)

Protocolstappen:

Stap-voor-stap-procedure

1. Volg de ImPath 36 gebruiksaanwijzing voor het plaatsen van het reagens voor gebruik op het instrument.
2. Laad de objectglaasjes, de FISH- probe en de ImPath ISH Detection Kit op de ImPath 36 in overeenstemming met de ImPath 36 gebruiksaanwijzing.

Stel de digestietijd voor Pepsine in overeenkomstig de door de gebruiker vooraf gevalideerde omstandigheden.

3. De run starten.
4. Wanneer de kleuringrun voltooid is, de objectglaasjes van het instrument verwijderen en gedurende 1 minuut achtereenvolgens met 70%, 90% en 100% ethanol drogen.
5. Monsters in het donker aan de lucht drogen.
6. Prepareren met een DAPI/Antifade-oplossing (het wordt aanbevolen om ImPath DAPI (cat.nr. 47861) te gebruiken) Afdekken met een dekglasje aan en gedurende 15 min. in het donker incuberen.
7. De objectglaasjes in het donker bij 2-8 °C opslaan.

Kwaliteitscontroleprocedures

Positieve weefselcontrole

Voor elke uitgevoerde kleuringprocedure moet altijd een positieve weefselcontrole uitgevoerd worden. Dit weefsel kan zowel versterkte (positieve) als niet-versterkte (negatieve) kleuringcellen bevatten, en dient als zowel positief als negatief controleweefsel.

Bekende positieve weefselcontroles moeten gebruikt worden voor het controleren van de juiste uitvoering van de verwerkte weefsels en testreagentia, niet als hulp voor het stellen van een specifieke diagnose van patiëntmonsters. Als de positieve weefselcontroles niet een juiste positieve kleuring aantonen, moeten de resultaten van de patiëntmonsters als ongeldig beschouwd worden.

Negatieve weefselcontrole

Hetzelfde weefsel dat gebruikt wordt voor de positieve weefselcontrole kan gebruikt worden voor de negatieve weefselcontrole.

Niet-neoplastische cellen op het objectglaasje/in de coupe van de tumor, zoals bijvoorbeeld fibroblasten, epitheliale cellen en/of lymfocyten dienen als interne controle en moeten het verwachte normale signaalpatroon vertonen, en kunnen daarom dienen als negatieve weefselcontrole. Als deze cellen niet een juiste kleuring vertonen, moeten de resultaten van het betreffende monster als ongeldig worden beschouwd.

Onverklaarbare verschillen

Onverklaarbare verschillen in controles moeten direct worden doorgegeven aan A.Menarini Diagnostics Customer Service. Als de resultaten van de kwaliteitscontrole niet voldoen aan de specificaties, zijn de patiëntresultaten ongeldig. Zie de paragraaf Probleemoplossing in deze bijsluiting. Stel het probleem vast en lost het op, en herhaal vervolgens de hele procedure met de patiëntmonsters.

Interpretatie van resultaten

Met het gebruik van passende filtersets worden de signalen van gemerkt ERBB2-gen oranje weergegeven, en worden de signalen van de hybridisatie van gemerkte a-satelliet DNA-sequenties van de centromeer van chromosoom 17 groen weergegeven. In interfases van normale cellen of cellen zonder aberraties van chromosoom 17, worden twee ERBB2-signalen en twee chromosoom 17-signalen weergegeven. In cellen met een genversterking zijn een groter aantal genspecifieke signalen of signaalclusters zichtbaar.

Let erop om geen overlappende cellen te beoordelen, zodat verkeerde resultaten, bijv. een versterking van genen, voorkomen worden. Als gevolg van gedecondenseerde chromatine, kunnen afzonderlijke FISH-signalen weergegeven worden als kleine signaalclusters. Daarom moeten twee of drie signalen van dezelfde grootte die gescheiden worden door een afstand die gelijk is aan of kleiner dan de diameter van één signaal, als één signaal geteld worden.

Weefselartefacten zoals weefsel op de grens of ingetrokken of samengeperst weefsel moeten van beoordeling uitgesloten worden. Patiëntweefsel niet beoordelen als de controles niet zoals verwacht zijn. Het object afkeuren als het een sterke autofluorescentie vertoont. Overmatige digestie kan herkend worden door donkere gebieden die aan de binnenkant van de kernen zichtbaar zijn, en moet uitgesloten worden van beoordeling.

Een negatief of onduidelijk resultaat kan veroorzaakt worden door meerdere factoren (Zie de paragraaf Probleemoplossing van deze bijsluiting).

Beperkingen

1. Dit reagens is "uitsluitend voor professioneel gebruik" omdat fluorescentie *in situ* hybridisatie een uit meerdere stappen bestaande procedure is die een gespecialiseerde training over de keuze van de juiste reagentia, weefsels, fixatie, verwerking, preparatie van het FISH-objectglaasje en interpretatie van de kleuringsresultaten vereist.
2. Uitsluitend voor gebruik in een laboratorium.
3. Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
4. Weefselkleuring, met name signaalintensiteit en achtergrondkleuring, is afhankelijk van de behandeling en verwerking van het weefsel voorafgaand aan kleuring. Onjuiste fixatie, bevriezen, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen, preparatie of besmetting van andere weefsels of vloeistoffen kan artefacten of verkeerde resultaten genereren. Inconsistente resultaten kunnen veroorzaakt worden door verschillen in methodes voor fixeren en inbedden, alsmede door inherente onregelmatigheden in het weefsel.
5. Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan een juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen.

6. De kwaliteit van de signalen hangt af van de juiste positionering van het weefsel op de onderste helft van het objectglaasje. Neem voor meer informatie over de juiste plaatsing van het weefsel contact op met uw contactpersoon bij A.Menarini Diagnostics.
7. De klinische interpretatie van positieve kleuring, of de afwezigheid hiervan, moet plaatsvinden binnen de context van de klinische voorgeschiedenis, morfologie, andere histopathologische criteria en andere diagnostische tests. Het is de verantwoordelijkheid van een gekwalificeerd patholoog om geïnformeerd te zijn over FISH- probe, reagentia, diagnostische panels en methoden die gebruikt worden voor het produceren van het gekleurde preparaat. Kleuring moet uitgevoerd worden in een gecertificeerd laboratorium onder toezicht van een patholoog die verantwoordelijk is voor de beoordeling van gekleurde objectglaasjes en waarborging van de geschiktheid van positieve en negatieve controles.
8. Gebruiksklare FISH-probe en reagentia worden geleverd in een verdunning die optimaal is voor het voorgeschreven gebruik. Elke afwijking van de aanbevolen testprocedures kan mogelijk verwachte resultaten ongeldig maken. Er moeten geschikte controles gebruikt en gedocumenteerd worden. Gebruikers moeten onder alle omstandigheden verantwoordelijkheid aanvaarden voor de interpretatie van patiëntresultaten.
9. Reagentia kunnen onverwachte reacties in niet eerder geteste weefsels vertonen. De mogelijkheid van onverwachte reacties kan, zelfs in groepen getest weefsel, niet volledig worden uitgesloten door de biologische verschillen in gezwellen of andere pathologische weefsels. Neem in geval van verdachte, gedocumenteerde onverwachte reacties contact op met de klantenservice van A.Menarini Diagnostics.

Verwachte resultaten

In de volgende tabel worden de prestaties van de ImPath HER2 FISH-sonde vergeleken met een CE-gecertificeerde handmatige HER2 FISH-sonde op formaline gefixeerd, in paraffine vult mammacarcinoomweefsel. Volgens ASCO richtlijn (2013) wordt een HER2/CEN 17 verhouding ≥ 2.0 als positief beschouwd.

		ImPath HER2 FISH		
		negatief (HER2/CEN 17 verhouding <2.0)	positief (HER2/CEN 17 verhouding ≥ 2.0)	totale
referentie	negatief (HER2/CEN 17 verhouding <2.0)	14	0	14
	positief (HER2/CEN 17 verhouding ≥ 2.0)	0	5	5
	totale	14	5	19

De ImPath HER FISH-probe biedt een hoge concordantie van 100%, specificiteit van 100% en gevoeligheid van 100% op mammacarcinoomweefsel indien uitgevoerd op de ImPath 36.

Probleemoplossing

1. Als zwakke of geen signalen waargenomen worden, is de proteolytische voorbehandeling mogelijk niet naar behoren uitgevoerd en moet de Pepsine-incubatietijd geoptimaliseerd worden.
2. Daarnaast kan een te lage concentratie wasbuffer tot zwakke signalen leiden. De concentratie van de wasbuffer moet bijgevolg gecontroleerd worden.
3. Een niet goed ingestelde fluorescentie-microscoop kan een andere reden voor een zwakke signaalintensiteit zijn. Zorg ervoor dat u een goed ingestelde en goed onderhouden fluoresceentiemicroscoop met passende filtersets gebruikt.
4. Ook een te sterke lichtstraal tijdens het verwerken van de probe/objectglasjes kan leiden tot zwakke of geen signalen. De verwerking van de –probe en de gekleurde objectglasjes moet beschermd tegen direct zonlicht uitgevoerd worden.
5. Als signalen van kruishybridisatie of sterke achtergrondkleuring optreden, is de proteolytische voorbehandeling misschien te sterk geweest en moet de incubatietijd van Pepsine geoptimaliseerd worden.
6. Daarnaast kan een te sterk geconcentreerde wasbuffer kruishybridisatie of sterke achtergrondkleuring tot gevolg hebben. De concentratie van de wasbuffer moet bijgevolg gecontroleerd worden.
7. Als weefselcoupes van de objectglasjes spoelen, moeten de objectglasjes gecontroleerd worden om ervoor te zorgen dat ze positief geladen zijn. Andere mogelijkheden die een nadelig effect op de hechting van het weefsel zouden kunnen hebben zijn onder meer onvoldoende drogen van de weefselcoupe vóór kleuring, of fixatie in formaline die niet goed neutraal gebufferd is. Ook de dikte van het weefsel kan een bijdragende factor zijn.

Voor corrigerende maatregelen verwijzen wij u naar de Stap-voor-stap-procedure, of u kunt contact opnemen met de klantenservice van A.Menarini Diagnostics.

Literatuur

- 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)