

# Leica HER2 FISH System - 30 Test Gebruiksaanwijzing

Bestemd voor het gebruik van het BOND-MAX and BOND-III-systeem van Leica Biosystems.

TA9217 is een product voor fluorescente *in situ* hybridisatie. Het is bestemd voor de kleuring van 30 tests (30 objectglasjes die zijn gekleurd met LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



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

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

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

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

Rx only

# Inhoudsopgave

<b>Beoogd gebruik</b> .....	<b>3</b>
Voor diagnostisch gebruik <i>in vitro</i> .....	3
Vereiste training.....	3
<b>Samenvatting en uitleg</b> .....	<b>3</b>
Achtergrond.....	3
Klinische concordantiesamenvatting voor het BOND-MAX System.....	4
Klinische concordantiesamenvatting voor het BOND-III System.....	4
Beginsel van de procedure.....	4
Meegeleverde componenten.....	5
Gebruiksaanwijzingen.....	5
Opslag en stabiliteit.....	5
Vorbereiding van monsters.....	5
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	6
<b>Procedure</b> .....	<b>6</b>
A. Vereiste maar niet meegeleverde reagentia.....	6
B. Vereiste maar niet meegeleverde apparatuur.....	6
C. Methodiek.....	7
D. Vorbereiding van Bond-enzymeconcentraat.....	7
E. Standaardkleuringsprotocol.....	7
F. Procedurele stappen.....	8
G. Opslag van objectglaasjes.....	9
<b>Evaluatie en telling van signalen</b> .....	<b>10</b>
Aanbevolen methode voor het vaststellen van de verhouding tussen LSI HER2 en CEP17.....	11
<b>Interpretatiegids voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test</b> .....	<b>12</b>
<b>Scoreblad voor monsters</b> .....	<b>13</b>
<b>Kwaliteitscontrole</b> .....	<b>14</b>
<b>Beperkingen</b> .....	<b>15</b>
A. Algemene beperkingen.....	15
B. Productspecifieke beperkingen.....	15
<b>Klinische concordantie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Borst</b> .....	<b>16</b>
2x2-concordantieresultaten voor het BOND-MAX System - Borst.....	16
2x2-concordantieresultaten voor het BOND-III System - Borst.....	17
<b>Klinische concordantie van de Leica HER2 FISH System - 30 Test met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrisch</b> .....	<b>18</b>
2x2 concordantieresultaten voor het BOND-MAX System - Gastrisch.....	18
<b>Precisieonderzoek – BOND-MAX System</b> .....	<b>20</b>
A. Onderzoek naar de precisie tijdens runs.....	20
B. Onderzoek naar de precisie binnen instrumenten.....	20
C. Onderzoek naar de precisie tussen runs.....	20
D. Onderzoek naar de precisie tussen laboratoria.....	20
E. Onderzoek naar de precisie tussen observatoren.....	20
F. Onderzoek naar de precisie tussen partijen.....	21
<b>Precisieonderzoek – BOND-III System</b> .....	<b>21</b>
G. Onderzoek naar de precisie binnen runs.....	21
H. Onderzoek naar de precisie binnen instrumenten.....	21
I. Onderzoek naar de precisie tussen runs.....	21
J. Onderzoek naar de precisie tussen laboratoria.....	22
K. Onderzoek naar de precisie tussen observatoren.....	22
L. Onderzoek naar de precisie tussen partijen.....	22
<b>Robuustheidsonderzoek</b> .....	<b>22</b>
<b>Probleemoplossing</b> .....	<b>24</b>
<b>Verwijzingen</b> .....	<b>26</b>
<b>Licentieovereenkomst</b> .....	<b>27</b>
<b>Aanpassingen ten opzichte van vorige editie</b> .....	<b>27</b>
<b>Publicatiedatum</b> .....	<b>27</b>
<b>Identificatie van symbolen</b> .....	<b>27</b>

## Beoogd gebruik

### Voor diagnostisch gebruik *in vitro*

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is bestemd voor de detectie van de amplificatie van de amplificatie van het HER2/neu-gen door middel van fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) weefselmonsters van menselijke borstkanker en adenocarcinomen van de maag (inclusief gastro-oesofageale overgang) die in formaline zijn gefixeerd en in paraffine zijn ingebed. Het Leica HER2 FISH System - 30 Test wordt aangeduid als een hulpmiddel voor de evaluatie van patiënten voor wie een behandeling met Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab) wordt overwogen (zie de bijsluiter in de Herceptin-verpakking). Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is niet bestemd voor het controleren op, of diagnosticeren van borstkanker. Daarnaast moet rekening worden gehouden met alle overige beschikbare klinische informatie, zoals de tumorgrootte, het aantal betrokken lymfklieren en de status van steroïdereceptoren. De beslissing om borstkankerpatiënten te behandelen mag in geen geval uitsluitend op de HER2-genamplificatiestatus worden gebaseerd.

N.B.: Alle patiënten die deelnamen aan de klinische trials voor Herceptin werden geselecteerd op basis van een klinische trialanalyse (CTA). Geen van de patiënten die aan deze trials deelnamen werden geselecteerd met behulp van het Leica HER2 FISH System - 30 Test. De resultaten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werden vergeleken met die van de analyse met de Abbott Molecular PathVysion<sup>®</sup> HER-2 DNA Probe Kit op basis van een onafhankelijke reeks van monsters. De concordantie van de resultaten werden acceptabel bevonden, zoals aangegeven in de klinische concordantiesamenvatting. De werkelijke correlatie tussen de resultaten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test en de klinische resultaten is niet vastgesteld.

Alle patiënten die deelnamen aan de klinische trials voor Herceptin<sup>®</sup> voor gevorderde maagkanker (ToGA) waren geselecteerd met behulp van de Dako HercepTest. Geen van de patiënten die aan deze trials deelnamen werden geselecteerd met behulp van de Leica HER2 FISH System - 30 Test. De resultaten van de Leica HER2 FISH System - 30 Test werden vergeleken met die van de analyse met de Abbott Molecular PathVysion<sup>®</sup>\* HER-2 DNA Probe Kit op basis van een onafhankelijke reeks van monsters. De concordantie van de resultaten werd acceptabel bevonden, zoals aangegeven in de klinische concordantiesamenvatting. De werkelijke correlatie tussen de resultaten van de Leica HER2 FISH System - 30 Test en de klinische resultaten is niet vastgesteld.

*\* Herceptin<sup>®</sup> is een merk van Genentech, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion<sup>®</sup> is een merk van Abbott Molecular Inc. Alle rechten voorbehouden. Gebruikt onder licentie.*

### Vereiste training

Leica Biosystems zal training verzorgen met betrekking tot de preparatie van monsters, de analyseprocedure en de interpretatie van de FISH-tests van het HER2-gen voor alle gebruikers.

## Samenvatting en uitleg

### Achtergrond

Het HER2-gen, ook wel aangeduid met de naam neu of c-erbB2, bevindt zich op de lange arm van chromosoom 17, en wel op positie 17q11-12 (1). Van zowel het HER2-gen als zijn 185 kD-gecodeerde eiwit is aangetoond dat zij een belangrijke rol spelen bij de kwaadaardige transformatie en uitbreiding van borstkanker (2).

HER2 fungeert als een prognostische marker, waarbij de genamplificatie en overexpressie van eiwit worden gekoppeld aan een verhoogde recidive van ziekte en een hogere sterfte. HER2 fungeert daarnaast als een voorspellende marker voor geselecteerde systemische chemotherapie en gerichte behandelingen (3). Meer in het bijzonder is aangetoond dat amplificatie van het HER2-gen duidt op een gebrekkige prognose bij klierpositieve borstkanker (4-8). Bovendien blijkt uit één onderzoek dat de prognostische waarde van HER2 hoger uitvalt bij patiënten die met chemotherapie worden behandeld (7). Voor de voorspelling van gezonde patiënten en de algehele overlevingskans van individuele patiënten moet echter tevens rekening worden gehouden met andere bekende prognostische factoren, zoals de tumorgrootte, het aantal positieve lymfeklieren en de status van steroïdereceptoren.

Overexpressie van het HER2-oncoproteïne als gevolg van de genamplificatie die in borstkankercellen wordt aangetroffen, maakt HER2 mogelijk een geschikt doelwit voor een op antilichamen gebaseerde therapie (3) - resultaten van de ToGA-trial geven duidelijk te zien, dat het gebruik van Herceptin® bij maagkanker in combinatie met chemotherapie een effectieve behandeling is die de algehele overlevingskans bij HER2 positieve maagkanker vergroot (9). Herceptin (trastuzumab) is een gehumaniseerd monoklonaal antilichaam (10) dat zich met hoge affiniteit hecht aan het HER2-oncoproteïne. Het is aangetoond dat dit middel de uitzaaiing remt van menselijke tumorcellen waarbij zowel *in vitro* als *in vivo* (11-13) sprake is van een overexpressie van het HER2-oncoproteïne. Sinds de ontwikkeling van Herceptin zijn de detectie van het HER2-gen en die van het HER2-eiwit uitgegroeid tot essentiële hulpmiddelen bij de evaluatie van borsttumoren. Ze spelen een bepalende rol bij de keuze voor een behandeling en het daaropvolgende patiëntbeheer (14,15).

In zowel interfase- als metafasecellen die zijn verkregen uit menselijke borstcarcinoom-cellijnen is FISH gebruikt om de HER2-genamplificatie aan te tonen (16-19). Voor de kwantificatie van de HER2-genamplificatie evalueert FISH het niveau van HER2-genamplificatie rechtstreeks in de tumorcellen. De kenmerkende morfologie van het weefsel en de ruimtelijke verdeling van oncogene kopieën in individuele ongekweekte primaire borstcarcinomen blijven behouden. Daarnaast worden in borsttumoren regelmatig afwijkingen van het aantal kopieën van chromosoom 17 (aneusomie) aangetroffen. Deze kunnen zich voordoen als verwijderingen van chromosoom of een stijging van het aantal chromosomen (polysomie). Deze chromosomatische variatie is van doorslaggevende invloed op de interpretatie en rapportage van de HER2-genamplificatiestatus. Om deze reden is de meting van het aantal kopieën van chromosoom 17 in verband met HER2 van kritisch belang (4).

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is uitgerust met de LSI HER2 DNA-sonde, een 190 Kb direct gelabelde, fluorescente SpectrumOrange™ DNA-sonde die specifiek is gericht op de HER2-genlocus (17q11.2-q12) en de CEP17 DNA-sonde, een 5,4 Kb direct gelabelde fluorescente SpectrumGreen™ DNA-sonde die specifiek is gericht op de volgorde van het alfa-satelliet-DNA op de centromerische regio van chromosoom 17 (17p11.1-q11.1). De sonde-oplossing is speciaal geformuleerd en goedgekeurd voor gebruik binnen het BOND-MAX and BOND-III System, en mag niet worden gewijzigd of in een handmatige situatie worden gebruikt.

## Klinische concordantiesamenvatting voor het BOND-MAX System

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is bedoeld als volledig geautomatiseerd alternatief voor huidige methodieken voor het vaststellen van de HER2-genamplificatiestatus. De prestatie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test binnen het BOND-MAX System werd geëvalueerd op basis van een onafhankelijk onderzoek dat de resultaten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test met die van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit analyse van 300 monsters van borsttumoren en van 109 adenocarcinomen van de maag (inclusief gastro-oesofageale overgang). Geen van deze tumormonsters werd verkregen van patiënten die hadden deelgenomen aan de klinische onderzoeken naar Herceptin. De resultaten van borstweefsel wezen op een concordantie van 99,33% in een 2x2 analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 97,61–99,92%). De resultaten van adenocarcinomen van de maag (inclusief weefsel van de gastro-oesofageale overgang) wezen op een concordantie van 98,17% in een 2x2 analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 93,53–99,78%). De concordantiegegevens geven tevens aan dat een positief resultaat met het Leica HER2 FISH System - 30 Test met een hoge mate van waarschijnlijkheid zal overeenkomen met een positief resultaat bij analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Het Leica HER2 FISH System - 30 Test wordt geïnterpreteerd als negatief voor de HER2-genamplificatie indien de HER2:CEP17-genverhouding minder bedraagt dan 2,0, en positief wanneer de HER2:CEP17-genverhouding groter is dan, of gelijk aan 2,0. Resultaten zonder uitsluitel (borderlineresultaten) waarbij de HER2:CEP17-genverhouding gelijk is aan, of tussen de 1,8 en 2,2 ligt, moeten met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Tel nog eens 20 kernen en bereken de verhouding opnieuw.

## Klinische concordantiesamenvatting voor het BOND-III System

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is bedoeld als volledig geautomatiseerd alternatief voor huidige methodieken voor het vaststellen van de HER2-genamplificatiestatus. De prestatie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test binnen het BOND-III System werd geëvalueerd op basis van een onafhankelijk onderzoek waarvoor de resultaten van het Leica HER2 FISH System - 30

Test werden vergeleken met die van de analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit voor 30 monsters van borsttumoren. Geen van deze tumormonsters werd verkregen van patiënten die hadden deelgenomen aan de klinische onderzoeken naar Herceptin. De resultaten wezen op een concordantie van 99,67 % in een 2x2-analyse (95 % betrouwbaarheidsintervallen van 98,16–99,99 %). De concordantiegegevens geven tevens aan dat een positief resultaat met het Leica HER2 FISH System - 30 Test met een hoge mate van waarschijnlijkheid zal overeenkomen met een positief resultaat bij analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Het Leica HER2 FISH System - 30 Test wordt geïnterpreteerd als negatief voor HER2-genamplificatie indien de HER2:CEP17-genverhouding minder bedraagt dan 2,0, en positief als de HER2:CEP17-genverhouding groter is dan, of gelijk aan 2,0. Resultaten zonder uitsluitel (borderlinerresultaten) waarbij de HER2:CEP17-genverhouding gelijk is aan, of tussen de 1,8 en 2,2 ligt, moeten met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Tel nog eens 20 kernen en bereken de verhouding opnieuw.

## Beginsel van de procedure

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test bevat componenten die vereist zijn om een op een fluorescente *in situ* hybridisatie gebaseerde kleuringsprocedure uit te voeren voor in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefsels. Na een relevante voorbehandeling, incubatie met de kant-en-klare LSI HER2/CEP17 Dual Probe en spoeling met de juiste mate van stringentie worden de weefselcoupes gedroogd en gemonteerd met DAPI. De resultaten worden geïnterpreteerd op basis van fluorescente microscopie, met behulp van de aanbevolen filters en op de juiste golflengten.

Het Leica HER2 FISH System - 30 Test is louter bestemd voor gebruik binnen het BOND-MAX and BOND-III System.

## Meegeleverde componenten

De hieronder vermelde materialen (tabel 1) zijn voldoende voor het kleuren van 30 tests (30 objectglasjes die worden gekleurd met LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

<b>LSI HER2/CEP17 Dual Probe</b> <b>6,6 mL</b>	Bevat kant-en-klare LSI HER2/CEP17 Dual Probe. Bevat <60 % (v/v) formamide.
<b>Post Hybridization Wash 2</b> <b>9 mL</b>	Bevat kant-en-klare spoelingsoplossing voor na de hybridisatie. Bevat <50 % (v/v) formamide.
<b>BOND Enzyme Concentrate 2</b> <b>1 mL</b>	Bevat Proteinase K-oplossing op 1,7 mg/mL.
<b>BOND Enzyme Diluent</b> <b>65 mL</b>	Bevat enzymverduunningsmiddel. Bevat 0,035% 2-methylisothiazol-3(2H)-one.
<b>BOND Open Container 3 x 7 mL</b>	BOND Open Container voor Enzyme 5

Tabel 1: Componenten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test

Raadpleeg voor meer informatie over de productveiligheid het speciale veiligheidsinformatieblad op [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

## Gebruiksaanwijzingen

Alle meegeleverde reagentia zijn speciaal geformuleerd voor gebruik voor deze analyse. De partijnummers zijn specifiek voor elk Leica HER2 FISH System - 30 Test. Om de geldigheid van de analyse te waarborgen mogen er geen vervangingen plaatsvinden.

## Opslag en stabiliteit

Sla het systeem op bij een temperatuur van 2 tot 8 °C. Vries het niet in. Laat het systeem direct na gebruik terugkeren naar een temperatuur van 2–8 °C. Elke afwijking van deze voorwaarden zal de analyse ongeldig maken. Zorg ervoor dat het Leica HER2 FISH System - 30 Test niet na de uiterste houdbaarheidsdatum wordt gebruikt. Tekenen van contaminatie en/of instabiliteit van het Leica HER2 FISH System - 30 Test zijn vertroebeling van de oplossingen (met uitzondering van de sondeoplossing) en geurontwikkeling. De gebruiker moet de opslagcondities verifiëren die anders zijn dan de hierboven beschreven condities.

## Vorbereiding van monsters

Voor alle monsters (20) dient gebruik te worden gemaakt van standaardmethoden voor het verwerken van weefsel. Het wordt aanbevolen om weefsels te prepareren in fixeerstoffen op basis van formaline en om de weefsels volgens de standaardprocedure te verwerken en in paraffine in te bedden. Monsters moeten bijvoorbeeld worden gecoupeerd op een dikte van 3–4 mm en gedurende 18 tot 24 uur worden gefixeerd in 10 % neutraal gebufferde formaline. De weefsels moeten vervolgens worden gedroogd in een reeks van alcoholen en gezuiverd met xyleen, gevolgd door impregnering met gesmolten paraffinewas die op een temperatuur onder de 60 °C wordt bewaard. Weefselmonsters moeten tussen de 4 en 6 µm worden gecoupeerd.

Weefselcoupes die op geladen objectglaasjes worden gemonteerd (BOND Plus Slides – productcode S21.2113 of Apex BOND Slides productcode 3800040) kunnen maximaal 12 maanden voor kleuring op een temperatuur van 2–8 °C worden bewaard. Aanbevolen wordt om objectglaasjes na weefselcoupure een uur lang op een temperatuur van 60 °C te incuberen. Gekleurde coupes moeten worden opgeslagen op een temperatuur van -20 °C om het fluorescente signaal te behouden en om ontkleuring te voorkomen. Laat opgeslagen objectglaasjes op kamertemperatuur komen alvorens ze af te lezen.

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

*Alleen bestemd voor professionele gebruikers.*

Een of meer onderdelen van het product zijn gevaarlijk en kunnen schade aan het ongeboren kind veroorzaken.

Personen onder de 18 jaar hebben geen toestemming om dit product te gebruiken. Gebruikers moeten grondig worden geïnstrueerd met betrekking tot de juiste werkprocedure, de gevaarlijke kenmerken van het product en de vereiste veiligheidsmaatregelen.

Monsters moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en volgens de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgedankt. Dit geldt tevens voor alle materialen die aan de monsters zijn blootgesteld.

Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Daarnaast moet contact tussen de huid/het slijmvlies en reagentia en monsters worden vermeden. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts. Raadpleeg de richtlijnen van de lokale of nationale overheid voor het afdanken van potentieel giftige componenten.

Minimaliseer de kans van microbacteriële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.

## Procedure

### A. Vereiste maar niet meegeleverde reagentia

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (AR9590)
- Standaardoplosmiddelen die worden gebruikt voor analyse op basis van fluorescente *in situ*-hybridisatie (bijv. ethanol, puur en verdund)
- Gedistilleerd of gedesoniseerd water
- DAPI tegenkleuring
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (CS9100)

## B. Vereiste maar niet meegeleverde apparatuur

- Pipetten (geschikt voor het meten van 1 – 20 µL- en 100 – 1000 µL-volumes)
- Geladen objectglaasjes (BOND Plus Slides – productcode S21.2113 of Apex BOND Slides productcode 3800040)
- BOND-MAX and BOND-III System
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 of S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Dekglaasjes
- Droogoven (in staat om een temperatuur van 60 °C in stand te houden)
- Fluorescentiemicroscop (60–100x objectiefvergroting) met de juiste lichtbron. Houd het aantal uren bij dat de lamp is gebruikt, en vervang de lamp voordat deze de nominale levensduur overschrijdt. Zorg ervoor dat de lamp op juiste wijze is uitgelijnd.
- De juiste fluorescentiefilterset (SpectrumOrange™ – opwekkingspiek op 559 nm, emissiepiek op 588 nm, SpectrumGreen™ – opwekkingspiek op 497 nm, emissiepiek op 524 nm en DAPI – opwekkingspiek op 367 nm, emissiepiek op 452 nm). Voor de meeste modellen microscopen zijn meervoudige banddoorlatende fluorescentiemicroscopiefiltersets beschikbaar die zijn geoptimaliseerd voor gebruik in combinatie met het Leica HER2 FISH System. Aanbevolen filtersets voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test zijn de DAPI/9-Orange met dubbele banddoorlating, de DAPI/Green met dubbele banddoorlating, de Green/Orange(V.2) met dubbele banddoorlating en de DAPI/Green/Orange (V.2) met driedubbele banddoorlating.

## C. Methodiek

- Alvorens deze methodiek ten uitvoer te leggen, moeten gebruikers relevante training ontvangen met betrekking tot het gebruik van de geautomatiseerde *in situ* fluorescente techniek.
- Elke testcoupe die met de LSI HER2/CEP17 Dual Probe wordt gekleurd maakt dezelfde celanalyse mogelijk van zowel de HER2-signalen als de signalen van het centromerische chromosoom 17. De daarop verkregen verhouding van HER2-signalen tot chromosoom 17-signalen maakt het mogelijk om een kwantitatieve waarde aan het monster toe te kennen ter aanduiding van een negatief (niet-versterkt) dan wel positief (versterkt) resultaat. Resultaten zonder uitsluitel, oftewel borderlineresultaten (1,8-2,2), moeten met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Tel nog eens 20 kernen en bereken de verhouding opnieuw.

## D. Voorbereiding van Bond-enzymeconcentraat

Vóór kleuring moet het meegeleverde BOND Enzyme Concentrate 2 in een verhouding van 1:300 worden verdund met behulp van de meegeleverde BOND Enzyme Diluent in een van de meegeleverde BOND Open Containers. Een voorbeeld: om 10 objectglaasjes te kleuren, moet 3 mL aan werkzame enzymoplossing worden geprepareerd door 10 µL BOND Enzyme Concentrate 2 te verdunnen met 2990 µL BOND Enzyme Diluent. Aanbevolen wordt om het enzym vóór elke kleuringrun vers te prepareren, en om een minimumvolume van 900 µL per run te gebruiken.

## E. Standaardkleuringsprotocol

Het wordt aanbevolen om het Leica HER2 FISH System - 30 Test te gebruiken op basis van het in tabel 2 aangegeven standaardkleuringsprotocol.

Type protocol	Naam protocol
Kleuring	*FISH Protocol A
Preparatie	*Dewax
HIER	*HIER 25 min with ER1 (97)
Enzym	*Enzyme 5 for 25 min.
Denaturatie	*D10
Hybridisatie	*ISH Hybridization (12Hr)

Tabel 2: Standaardkleuringsprotocol Leica HER2 FISH System 30 Test Staining Protocol

## F. Procedurele stappen

Deze instructies moeten worden gelezen in samenhang met de gebruiksaanwijzing van het BOND-MAX and BOND-III System. Voor elk objectglaasje moet een nieuw BOND Universal Covertile-dekglasje worden gebruikt.

Het gebruik van BOND Universal Covertiles die eerder zijn gebruikt voor immunohistochemische of *in situ* hybridisatiekleuring zijn niet gevalideerd voor deze test.

1. Zorg ervoor dat de bulkcontainers en containers voor gevaarlijk afvalmateriaal van het BOND-MAX and BOND-III-systeem voldoende capaciteit hebben om de vereiste kleuringsruns uit te voeren.
2. Zorg ervoor dat er voldoende alcohol, gedestilleerd of gedesoniseerd water, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 en BOND Wash Solution (tot x10 verdund) in de bulkreagenscontainers aanwezig is om de vereiste kleuringsruns uit te voeren.
3. Controleer of een schoon BOND Mixing Station is geïnstalleerd.
4. Schakel het BOND-MAX and BOND-III System in.
5. Schakel de PC in die op het BOND-MAX and BOND-III System is aangesloten.
6. Open de BOND-software.
7. Als u een nieuwe Leica HER2 FISH System - 30 Test kit gebruikt, moet u de streepjescode voor de reagenslade scannen met de handheld scanner om het systeem in de BOND reagensvoorraad in te voeren (slechts één streepjescode).
8. Prepareer het BOND Enzyme 5 in de meegeleverde BOND Open Container in een verdunning van 1:300. Een voorbeeld: voor 10 objectglasjes moet 10µL van BOND Enzyme Concentrate 2 worden toegevoegd met 2990 µL BOND Enzyme Diluent.
9. Scan de meegeleverde BOND Open Container en registreer deze als **Bond Enzyme 5**.
10. Ga naar het venster Slide setup en klik op **Add case**.
11. Voer de gegevens voor het eerste weefselmonster in. Zorg ervoor dat het afgiftevolumen is ingesteld op **150 µL** en dat het preparatieprotocol is ingesteld op **\*Dewax**. Klik op **OK**.
12. Klik nadat u in het venster Slide setup het weefselmonster heeft gemarkeerd op **Add slide**.
13. Voeg eerst de test-objectplaatjes voor de patiënten in. Zorg ervoor dat het weefseltype is ingesteld op **Test tissue**.
14. Selecteer de kleuringsmodus **Single**.
15. Selecteer het proces **ISH**.
16. Selecteer in de lijst met sondes de optie **\*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30 Test**. Op het tabblad Protocols zullen automatisch het juiste kleuringsprotocol (**\*FISH Protocol A**), HIER-protocol (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**), EIER-protocol (**\*Enzyme 5 for 25 min**), denaturatie (**\*D10**) de hybridisatie (**\*ISH Hybridization (12Hr)**) worden ingesteld.
17. Herhaal stappen 10 tot en met 16 totdat de test-objectglasjes en controle-objectglasjes voor de patiënten (Leica HER2 FISH controle-objectglasjes en/of bedrijfseigen controleglasjes) zijn gemaakt. Druk de labels voor objectglasjes af.
18. Voorzie de objectglasjes van het juiste label.
19. Open de deksels van alle containers van het Leica HER2 FISH System - 30 Test en voer de reagenslade in het BOND-MAX and BOND-III System in.
20. Breng op elk objectglasje nieuwe dekglasjes aan.
21. Voer de lade met objectglasjes in het BOND-MAX and BOND-III System in en druk op de knop **Load/Unload**.
22. Controleer of de objectplaatjes zijn gescand en klik op de knop **Run (Play)** in het venster System status om de run direct uit te voeren (voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test wordt aanbevolen om deze controle na één nacht uit te voeren met behulp van de vertraagde startfunctionaliteit).
23. Controleer of het veld Tray indicator de status **Proc (OK)**, het partijnummer en het tijdstip van voltooiing aangeeft.



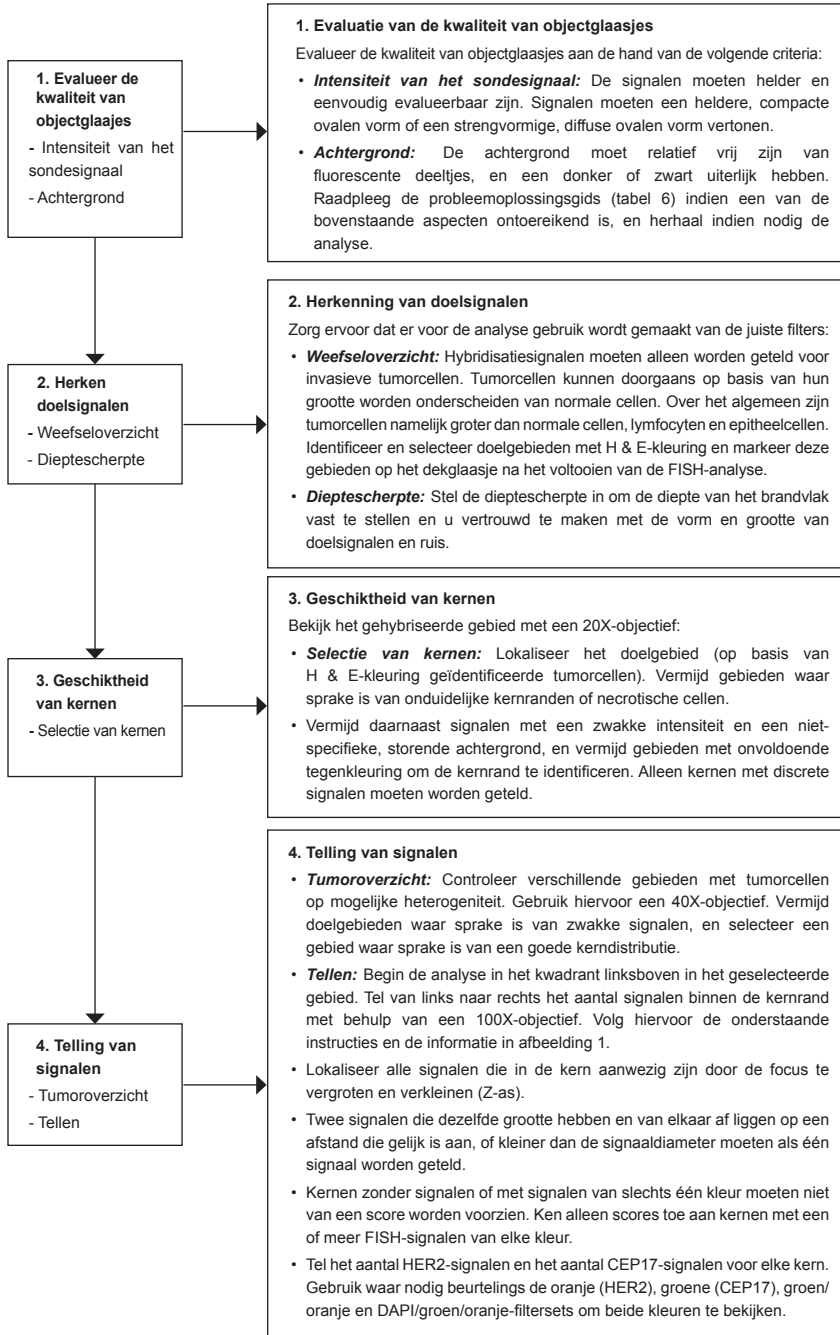
24. Na voltooiing van de run drukt u op de knop **Load/Unload** en verwijdert u de lade met objectglaasjes uit het BOND-MAX and BOND-III System.
25. Verwijder de dekglasjes en spoel de objectglaasjes schoon met gedesoniseerd water.
26. Droog de objectglaasjes snel met twee soorten alcohol, luchtdroog.
27. Breng 20µL DAPI rechtstreeks op het monster aan.
28. Breng een dekglasje aan en laat de oplossing zich zo ver mogelijk verspreiden. Verwijder eventuele luchtballen.
29. Dicht de rand van het dekglasje af met nagellak of een vergelijkbaar afdichtingsmiddel.
30. Bewaar de objectglaasjes in het donker om de ontwikkeling van signalen zijn loop te laten alvorens de glaasjes onder de fluorescentiemicroscopie te bekijken.
31. Om de signaalintensiteit te behouden, moeten gekleurde objectglaasjes op een temperatuur van -20 °C worden bewaard.

### **G. Opslag van objectglaasjes**

Bewaar gekleurde objectglaasjes in het donker op een temperatuur van -20 °C. Laat objectglaasjes vóór controle op kamertemperatuur komen nadat u deze uit een opslagomgeving met een temperatuur van -20 °C heeft gehaald.

## Evaluatie en telling van signalen

Voor het evalueren van de signaalkwaliteit en het tellen van de HER2- en CEP17-signalen moet de volgende procedure worden gevolgd:



## Aanbevolen methode voor het bepalen van de verhouding tussen LSI HER2 en CEP17

Om de verhouding tussen LSI HER2 en CEP17 te bepalen, gebruikt u de volgende methode:

1. Bepaal het aantal LSI HER2- en CEP17-signalen in 20 kernen en noteer dit aantal (zie afbeelding 2, Scoreblad voor het Leica HER2 FISH System).
2. Tel alle LSI HER2-signalen bij elkaar op. Dit vertegenwoordigt het totaal van LSI HER2-signalen voor de telling, bijvoorbeeld 143.
3. Tel alle CEP17-signalen bij elkaar op. Dit vertegenwoordigt het totale aantal getelde CEP17-signalen, bijvoorbeeld 48.
4. Om het uiteindelijke resultaat te berekenen, hanteert u de volgende berekening: tel alle LSI HER2-signalen bij elkaar op en deel deze door het totale aantal CEP17-signalen, bijv.  $143/48$  komt overeen met een verhouding van 2,98, hetgeen een positieve score voor HER2-amplificatie oplevert.

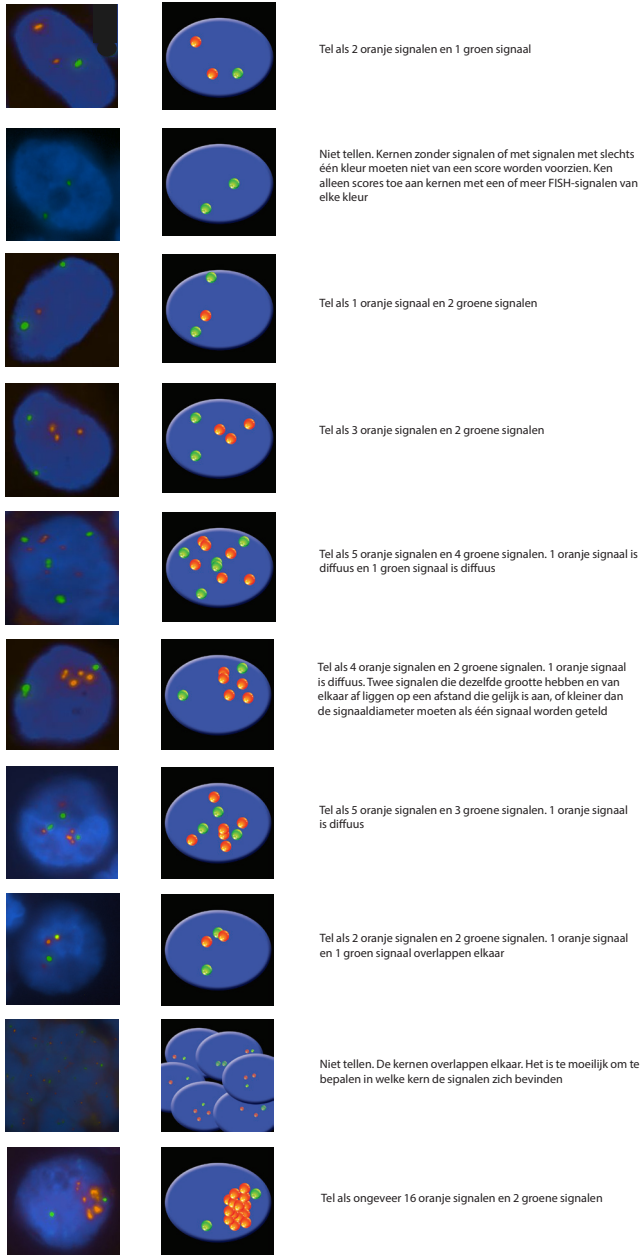
**Belangrijk: Als de verhouding tussen LSI HER2 en CEP17 geen uitsluitel biedt (1,80 - 2,20), moet u nog eens 20 kernen tellen en de verhouding opnieuw berekenen.**

De resultaten moeten als volgt worden gerapporteerd:

1. Bij een verhouding  $<2$  is er geen HER2-genamplificatie geobserveerd
2. Bij een verhouding  $\geq 2$  is er HER2-genamplificatie geobserveerd

**Belangrijk: Een verhouding op of nabij de bovengrens (1,80 - 2,20) moet met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd, zoals hierboven beschreven.**

# Interpretatiegids voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test



Afbeelding 1: Interpretatiegids

## Scoreblad voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test

Telling van 20 kernsignalen					
Aantal nucleï.	Aantal HER2-kopieën	Aantal CEP17-kopieën	Aantal nucleï.	Aantal HER2-kopieën	Aantal CEP17-kopieën
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Totaal 1-10			Totaal 11-20		

	HER2	CEP17	HER2:CEP17-amplificatieverhouding
Totale score 1-20			
Gemiddeld per cel			

Figuur 2: Scoreblad voor monsters

## Ariols methode voor HER2 FISH-bepaling

Onafhankelijke validatie van het gebruik van het Ariol PathVysion® digitale scoringsprogramma als hulpmiddel bij de interpretatie is uitgevoerd op een ander cohort monsters met het Leica HER2 FISH System. Bij gebruik met het Leica HER2 FISH System is het Ariol PathVysion bestemd voor diagnostisch gebruik in vitro. Bij gebruik in combinatie met het Leica HER2 FISH System dient het Ariol PathVysion programma voor gebruik te worden gekalibreerd met glaasjes met controleweefsel, **niet** met de Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123).

**Alle diagnostische beslissingen worden gemaakt door een gekwalificeerd clinicus.**

Raadpleeg voor meer informatie de gebruikershandleiding van Ariol.

## Kwaliteitscontrole

### Gebruik van controle-objectglaasjes

Het wordt aanbevolen om voor elke testrun gebruik te maken van een Leica HER2 FISH Control Slide voor het bewaken van de analyseprestatie en het evalueren van de nauwkeurigheid van de signaaltelling. Voor elke kleuringbatch in het BOND-MAX and BOND-III System en voor elke nieuwe partij reagentia moet een run met controle-objectglaasjes worden uitgevoerd. Daarnaast kunnen individuele gebruikers ervoor kiezen om hun eigen controlemateriaal te gebruiken.

Evalueer de kwaliteit van controle-objectglaasjes en voer een signaaltelling uit volgens de aanwijzing in het gedeelte **Evaluatie en telling van signalen**. Er moet worden voldaan aan de criteria voor de kwaliteit van objectglaasjes. Daarnaast moeten de resultaten voor de HER2:CEP17-verhouding binnen het vastgestelde bereik voor een acceptabele testprestatie vallen. Zie tabel 3 voor acceptatiecriteria van de Leica HER2 FISH Control Slides.

Cellijn	Profiel Bond Oracle HER2 IHC System	Aantal HER2-receptoren per cel*	HER2:CEP17-acceptatiecriteria voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test
SKBr-3	3+	$4,3 \times 10^5$	HER2-amplificatie geobserveerd
MDA-MB-453	2+	$1,4 \times 10^5$	HER2/CEP17-genverhouding moet tussen de 1,5 en 2,5 liggen
MDA-MB-175	1+	$6,3 \times 10^4$	Geen HER2-amplificatie geobserveerd
MDA-MB-231	0	$9,3 \times 10^3$	Geen HER2-amplificatie geobserveerd

\*Analyse van het aantal HER2-receptoren, geëvalueerd op basis van doorstroomcytometrie

Tabel 3: Interpretatie van de Leica HER2 FISH Control Slide.

Als de verificatiecontroles mislukken, moeten de FISH-resultaten voor het desbetreffende weefselmonster niet worden gerapporteerd. Indien controle-objectglaasjes niet voldoen aan de acceptatiecriteria voor objectglaasjes, is er mogelijk sprake geweest van een onjuiste prestatie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test. In dit geval moet een herhalingstest worden uitgevoerd met verse controle-objectglaasjes en een of meer objectglaasjes met patiëntmonsters. Als de resultaten buiten het gespecificeerde bereik vallen, maar de controle-objectglaasjes voldoen aan de acceptatiecriteria voor kwaliteit, kan het nodig zijn om hetzelfde objectglaasje opnieuw te controleren daar de telling mogelijk niet op juiste wijze is uitgevoerd. Raadpleeg de probleemoplossingsgids (tabel 6) in het geval van een mislukte hybridisatie voor het monster of een of meer objectglaasjes.

Voor klinische monsters is de test niet informatief als de hybridisatiesignalen moeilijk te interpreteren zijn en er onvoldoende monstermateriaal beschikbaar is voor een hernieuwde analyse. Als er onvoldoende cellen beschikbaar zijn voor analyse, is de test niet informatief.

Patiëntmonsters moeten worden behandeld volgens de standaard bedrijfsprocedures voor laboratoria. De signaalkwaliteit en tellingsresultaten moeten worden genoteerd op een daartoe bestemd rapportageformulier.

## Beperkingen

### A. Algemene beperkingen

FISH is een techniek die speciale training vereist met betrekking tot alle procedurele aspecten (inclusief de selectie van de juiste reagentia, het weefsel en de fixering, verwerking en preparatie van objectglasjes) en de interpretatie. De weefselkleuring is afhankelijk van de omgang, fixatie en verwerking van het weefsel die aan de kleuring vooraf gingen. Een onjuiste wijze van fixeren, invriezen, ontdoeien, wassen, drogen, verwarmen en opdelen kan wel contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kunnen leiden tot artefacten, degradatie van nucleïnezuur, achtergrondfluorescentie of fout-negatieven. Inconsistente resultaten kunnen het gevolg zijn van variaties in fixering, inbeddingsmethoden of inherente onregelmatigheden binnen het weefsel (21). Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan eveneens een juiste interpretatie van de resultaten in te weg zitten.

Niet-specifieke kleuring als gevolg van niet-gebonden sondemateriaal kenmerkt zich door een verspreid, korrelig uiterlijk en kan op de verwachte hybridisatielokatie of ver daarvan verwijderd te zien zijn. Maak voor de interpretatie van kleuringsresultaten gebruik van intacte cellen. Necrotische of gedegenererde cellen kunnen niet-specifieke kleuring vertonen (22). Onverwachte FISH-kleuring, of variaties in de kleuring, kunnen het resultaat zijn van wijzigingen in de expressieniveaus van de coderingsgenen. Elke wijziging in de verwachte kleuringspatronen moet worden geïnterpreteerd in samenhang met alle andere diagnostische onderzoeksactiviteiten. De interpretatie van de kleuring moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en het gebruik van geschikt controle materiaal. De interpretatie moet worden geëvalueerd door een vakkundige patholoog binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventueel ander diagnostisch onderzoek.

De analyseprestatie (d.w.z. de evaluatie van de geschiktheid van de controle materialen) en de interpretatie van eventuele kleuring of de afwezigheid daarvan dient te worden uitgevoerd in een toepasselijk geaccrediteerd/gelicenseerd laboratorium onder de supervisie van een relevant gekwalificeerde en ervaren patholoog die verantwoordelijk is voor de algehele evaluatie van de *in situ* hybridisatieanalyse en de interpretatie daarvan. Fout-positieven in FISH kunnen het gevolg zijn van kruisreactiviteit van de sonde met andere nucleïnezuurreksen en/of niet-specifieke hechting. De juiste controles moeten worden gebruikt en gedocumenteerd. Daarnaast moeten tests rekening houden met alle relevante uiterste houdbaarheidsdata's.

Er kan eveneens sprake zijn van technische variatie en variatie in interpretatie indien FISH wordt toegepast op uit cellijnen verkregen materialen (23).

### B. Productspecifieke beperkingen

Dit product is niet bestemd voor gebruik in combinatie met een andere diagnostische analyse die op DNA is gebaseerd.

Vervang de Leica HER2 FISH System - 30 Test -reagentia niet door andere componenten van Leica Biosystems of andere fabrikanten. Hierdoor zal de analyse ongeldig worden. De gebruiker moet controleren op eventuele afwijkingen van de aanbevolen procedures.

Het wordt aanbevolen om voor de verificatie alleen gebruik te maken van weefsels die met fixeerstoffen op basis van formaline zijn gefixeerd. Het gebruik van elk ander type fixeerstof zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

Weefselcoupes die buiten het aanbevolen diktebereik vallen, zijn niet gevalideerd. Het gebruik van elke andere coupedikte zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

## Klinische concordantie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Borst

Dit onderzoek had ten doel om de geschiktheid van het Leica HER2 FISH System - 30 Test te evalueren als hulpmiddel voor het vaststellen van een mogelijke behandeling met Herceptin (trastuzumab). Het onderzoek had ten doel om de concordantie te evalueren tussen het Leica HER2 FISH System - 30 Test en een eerder goedgekeurd diagnostisch apparaat, de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, die wordt beschouwd als de 'gouden standaard' voor deze analyse van borstweefsel. Het acceptatiecriterium voor de tests was dat de ondergrens van het eenzijdige betrouwbaarheidsinterval van 95 % boven de 90 % ligt tussen het Leica HER2 FISH System - 30 Test en de manual Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, tussen positieve (versterkte) en negatieve (niet-versterkte) in formale gefixeerde en in paraffine ingebedde (FFPE) monsters met invasieve borstkankerweefsel.

Het onderzoek werd uitgevoerd als een geblindeerde evaluatie van klinische monsters van invasieve borstcarcinoom. Elk van de onderzoekslocaties ontving gearchiveerde, in formale gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselblokken met invasieve borstcarcinoom met bekende expressie niveaus van het HER2-oncoproteïne. Een cohort van 300 monsters bestaande uit 75, eerder als 0/1+ aangemerkte IHC-weefselmonsters; 150, eerder als 2+ aangemerkte IHC-weefselmonsters en 75 eerder als 3+ aangemerkte IHC-weefselmonsters werd geselecteerd en evenredig verdeeld tussen de drie onderzoekslocaties.

Alle weefselmonsters werden gekleurd met de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit volgens de gebruiksaanwijzingen van de fabrikant in de bijsluiting van de verpakking. Vervolgens werden opeenvolgende coupes voor elk weefselmonster gekleurd met behulp van het Leica HER2 FISH System - 30 Test binnen het BOND-MAX and BOND-III System.

Alle gekleurde objectglaasjes werden geblindeerd en op elk van de drie locaties in willekeurige volgorde van een score voorzien door een getrainde observator. De scores werden geïnterpreteerd als negatief bij een berekende HER2/CEP17-genverhouding van  $<2,0$  en positief bij een berekende HER2/CEP17-genverhouding van  $\geq 2,0$ . De gegevens werden vervolgens geanalyseerd op concordantie en overeenkomstige positieve en negatieve kleuring.

### 2x2 concordantieresultaten voor het BOND-MAX System - Borst

De gegevens werden gegroepeerd als negatief ( $<2,00$ ) dan wel positief ( $\geq 2,00$ ) op basis van een 2x2-analyse. De op basis van een 2x2-analyse voor 300 monsters geobserveerde overeenkomsten tussen de twee tests wijzen op een concordantie van 99,33 % (298 van de 300) bij een 95 % CI (betrouwbaarheidsinterval) van 97,61–99,92 % voor het BOND-MAX System.

Het percentage Positieve Overeenkomst (gevoeligheid) ofwel het vermogen van het Leica HER2 FISH System - 30 Test om positieve weefselmonsters uit de analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe te identificeren (het percentage van alle positieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit die een positieve score werden toegekend door zowel het Leica HER2 FISH System als de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) bedroeg 99,03 % (102/103).

Het percentage Negatieve Overeenkomst (specificiteit) ofwel het vermogen van de test om negatieve monsterweefsels uit de analyse van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit correct te identificeren (het percentage van alle negatieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit die een negatieve score werden toegekend door zowel het Leica HER2 FISH System - 30 Test) bedroeg 99,49 % (196 van de 197). Zie tabel 4.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negatief ( $<2,0$ )	Positief ( $\geq 2,0$ )	Totaal
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negatief ( $<2,0$ )	196	1	197
	Positief ( $\geq 2,0$ )	1	102	103
	Totaal	197	103	300

Totale concordantie (95 % CI) = 99,33 % (97,61 – 99,92 %)

Tabel 4. 2x2-concordantie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test voor het BOND-MAX System met Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit van borstweefsel.



## 2x2-concordantieresultaten voor het BOND-III System - Borst

Gegevens werden gegroepeerd als negatief (<2,0) dan wel positief (≥2,0) op basis van een 2x2-analyse. De op basis van een 2x2-analyse voor 300 monsters geobserveerde overeenkomsten tussen de twee tests wijzen op een concordantie van 99,67 % (299 van de 300) met een 95 % CI van 98,16–99,99 % voor het BOND-III System.

Het percentage Positieve Overeenkomst (gevoeligheid) oftewel het vermogen van het Leica HER2 FISH System - 30 Test om positieve weefselmonsters uit de analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit correct te identificeren (het percentage van alle positieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit die een positieve score werden toegekend door zowel het Leica HER2 FISH System - 30 Test als de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) bedroeg 99,03 % (102 van de 103).

Het percentage Negatieve Overeenkomst (specificiteit) ofwel het vermogen van de test om negatieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit correct te identificeren (het percentage van negatieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit waaraan een negatieve score werd toegekend door zowel het Leica HER2 FISH System als de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) bedroeg 100 % (197 van de 197). Zie tabel 5.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negatief (<2,0)	Positief (≥2,0)	Totalen
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III	Negatief (<2,0)	197	1	198
	Positief (≥2,0)	0	102	102
	Totalen	197	103	300

Totale concordantie (95 % CI) = 99,67 % (98,16 – 99,99 %).

Tabel 5. 2x2-concordantie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test voor het BOND-III System met Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit van borstweefsel.

Samenvattend tonen de op basis van dit onderzoek verkregen gegevens aan dat het Leica HER2 FISH System - 30 Test kan wordt gebruikt als hulpmiddel voor de evaluatie van patiënten voor wie een behandeling met Herceptin (trastuzumab) wordt overwogen, gezien de hoge mate van concordantie van het systeem met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, een eerder voor deze indicatie goedgekeurde diagnostische test.

## Klinische concordantie van de Leica HER2 FISH System - 30 Test met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Gastrisch

Dit onderzoek had ten doel om de geschiktheid van de Leica HER2 FISH System - 30 Test te bepalen als hulpmiddel voor het vaststellen van een mogelijke behandeling met Herceptin (trastuzumab). Het onderzoek had ten doel om de concordantie te bepalen tussen de Leica HER2 FISH System - 30 Test en een eerder goedgekeurd diagnostisch apparaat, de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, die wordt beschouwd als de 'gouden standaard' voor deze analyse van maagweefsel. Het acceptatiecriterium voor de tests was dat de ondergrens van het eenzijdige betrouwbaarheidsinterval van 95% boven de 90% ligt tussen de Leica HER2 FISH System - 30 Test en de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, tussen positieve (versterkte) en negatieve (niet-versterkte) in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde (FFPE) adenocarcinomen van de maag (inclusief gastrooesofageale overgang).

Het onderzoek werd uitgevoerd als een evaluatie van klinische monsters van invasieve maagadenocarcinomen. De test werd uitgevoerd op gearhiveerde, in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselblokken van maagadenocarcinomen met bekende expressieniveaus van het HER2 gen. Er werd een cohort van 109 monsters bestaande uit 50 versterkte weefselmonsters en 59 niet-versterkte weefselmonsters geselecteerd.

Alle weefselmonsters werden gekleurd met de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit volgens de instructies van de fabrikant in de bijsluiting van de verpakking. Vervolgens werden opeenvolgende coupes voor elk weefselmonster gekleurd met behulp van Leica HER2 FISH System - 30 Test voor het BOND-MAX System.

Alle gekleurde objectglasjes werden in willekeurige volgorde van een score voorzien door een getrainde waarnemer. De scores werden geïnterpreteerd als negatief bij een berekende HER2/CEP17-genverhouding van  $<2,0$  en positief bij een berekende HER2/CEP17-genverhouding van  $\geq 2,0$ . De gegevens werden vervolgens geanalyseerd op concordantie en overeenkomstige positieve en negatieve kleuring.

### 2x2 concordantieresultaten voor het BOND-MAX System - Gastrisch

Gegevens werden gegroepeerd als negatief ( $<2,00$ ) dan wel positief ( $\geq 2,00$ ) op basis van een 2x2-analyse. De voor 109 monsters geobserveerde overeenkomsten tussen de twee tests wijzen op een concordantie van 98,17% (107/ 109) met een 95% CI van 93,53–99,78% voor het BOND-MAX System.

Het percentage Positieve Overeenkomst (gevoeligheid) ofwel het vermogen van de Leica HER2 FISH System - 30 Test om positieve weefselmonsters uit de analyse met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe te identificeren (het percentage van alle positieve monsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit die een positieve score werden toegekend door zowel de Leica HER2 FISH System - 30 Test als de handmatige Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) bedroeg 96,00% (48/50).

Het percentage Negatieve Overeenkomst (specificiteit) ofwel het vermogen van de test om negatieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit correct te identificeren (het percentage van negatieve weefselmonsters van de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit waaraan een negatieve score werd toegekend door zowel de Leica HER2 FISH System - 30 Test als de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) bedroeg 100% (59/59). Zie tabel 6.

		Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negatief (<2,0)	Positief (≥2,0)	Totalen
Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX	Negatief (<2,0)	59	2	61
	Positief (≥2,0)	0	48	48
	Totalen	59	50	109

Totale concordantie (95% CI) = 98,17% (93,53 –99,78%)

Tabel 6. 2x2-concordantie van de Leica HER2 FISH System - 30 Test voor het BOND-MAX System met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.

## Precisieonderzoek – BOND-MAX System

### A. Onderzoek naar de precisie tijdens runs

Het onderzoek naar de precisie binnen runs werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek van de precisie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test binnen runs werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie op basis van 540 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het vaststellen van de precisie binnen runs maakte het mogelijk om binnen één run binnen één instrument gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Op basis van een telling van de objectglaasjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie binnen runs, toonden 532 van de 540 weefselmonsters een concordant resultaat. Dit komt overeen met een totale concordantie van 98,52 %, bij een lagere 95 % CI van 97,10 %.

### B. Onderzoek naar de precisie binnen instrumenten

Het onderzoek naar de precisie binnen instrumenten werd op geblinde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie binnen instrumenten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie voor 1620 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie binnen instrumenten maakte het mogelijk om tijdens meerdere runs op één instrument gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectglaasjes die tijdens het onderzoek naar de precisie binnen instrumenten werd uitgevoerd, bleek dat 1620 van de 1620 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat toonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 100 %, bij een lagere 95 % CI van 99,82 %.

### C. Onderzoek naar de precisie tussen runs

Het onderzoek naar de precisie tussen runs werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie tussen runs van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie voor 900 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie tussen runs tijdens dagelijkse tests maakte het mogelijk om tussen runs die op verschillende dagen werden uitgevoerd gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een breder bereik van HER2-expressie.

Uit een telling van de objectglaasjes die tijdens het onderzoek naar de precisie tussen runs werd uitgevoerd, bleek dat 894 van de 900 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat toonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 99,33 %, met een lagere 95 % CI van 98,55 %.

### D. Onderzoek naar de precisie tussen laboratoria

Het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op drie onderzoekslocaties voor 513 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie tussen laboratoria maakte het mogelijk om tussen runs op verschillende instrumenten gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectglaasjes die tijdens het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria werd uitgevoerd, bleek dat 510 van de 513 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat vertoonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 99,42 % bij een lagere 95 % CI van 98,30 %.

### E. Onderzoek naar de precisie tussen observanten

Het onderzoek naar de precisie tussen observanten werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de reproduceerbaarheid tussen observatoren van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op drie verschillende onderzoekslocaties. Op elke onderzoekslocatie werd gebruikgemaakt van één ervaren observator. 18 volledige weefselmonsters met borstkanker werden gebruikt voor het bepalen van de precisie tussen observanten. Hierbij werd gebruikgemaakt van monstertypes die in een klinische situatie zouden worden gebruikt.

Uit een telling van de objectglasjes die tijdens het onderzoek naar de precisie tussen observatoren werden gekleurd, bleek dat 53 van de 54 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat toonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 98,15 % bij een lagere 95 % CI van 90,11 %.

## **F. Onderzoek naar de precisie van partij tot partij**

Het onderzoek naar de precisie van partij tot partij werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. De precisie van partij tot partij werd vastgesteld voor drie onafhankelijk geproduceerde partijen van het Leica HER2 FISH System - 30 Test die waren geproduceerd op basis van de Good Manufacturing Practice (GMP). Elke partij werd getest op één onderzoekslocatie op 540 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van partij tot partij maakt het mogelijk om gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectplaatjes die werden gekleurd voor het onderzoek naar de precisie van partij tot partij toonden 534 van de 540 weefselmonsters een concordant resultaat, waarmee de totale concordantie uitkwam op 98,89 % bij een lagere 95 % CI van 97,60 %.

## **Precisieonderzoek – BOND-III System**

### **G. Onderzoek naar de precisie binnen runs**

Het onderzoek naar de precisie binnen runs werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek van de precisie van het Leica HER2 FISH System - 30 Test binnen runs werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie op basis van 540 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het vaststellen van de precisie binnen runs maakte het mogelijk om binnen één run binnen één instrument gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectplaatjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie binnen runs toonden 540 van de 540 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat, waarmee de totale concordantie uitkwam op 100 % bij een lagere 95 % CI van 99,45 %.

### **H. Onderzoek naar de precisie binnen instrumenten**

Het onderzoek naar de precisie binnen instrumenten werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie binnen instrumenten van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie voor 1620 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie binnen instrumenten maakte het mogelijk om tijdens meerdere runs op één instrument gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectplaatjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie tussen runs toonden 1620 van de 1620 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat, waarmee de totale concordantie uitkwam op 100 %, met een lagere 95 % CI van 99,82 %.

### **I. Onderzoek naar de precisie tussen runs**

Het onderzoek naar de precisie tussen runs werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie tussen runs van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op één onderzoekslocatie voor 900 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie tussen dagelijkse runs maakte het mogelijk voor het testen tussen runs die op verschillende dagen werden uitgevoerd gebruik te maken van een grote volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectplaatjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie tussen runs bleek dat 891 van de 900 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat toonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 99,00 % bij een lagere 95 % CI van 98,11 %.

## J. Onderzoek naar de precisie tussen laboratoria

Het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op drie onderzoekslocaties voor 513 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de precisie tussen laboratoria maakte het mogelijk om tussen runs op verschillende instrumenten gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectglaasjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie tussen laboratoria toonden 511 van de 513 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat, waarmee de totale concordantie uitkwam op 99,61 % bij een lagere 95 % CI van 98,60 %.

## K. Onderzoek naar de precisie tussen observatoren

Het onderzoek naar de precisie tussen observanten werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. Het onderzoek naar de reproduceerbaarheid tussen observatoren van het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd geëvalueerd op drie verschillende onderzoekslocaties. Op elke onderzoekslocatie werd gebruikgemaakt van één ervaren observator. 18 volledige weefselmonsters met borstkanker werden gebruikt voor het bepalen van de precisie tussen observanten. Hierbij werd gebruikgemaakt van monstertypes die in een klinische situatie zouden worden gebruikt.

Uit een telling van de objectglaasjes die werden gekleurd in het onderzoek naar de precisie tussen observanten toonden 53 van de 54 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat, waarmee de totale concordantie uitkwam op 98,15 % bij een lagere 95 % CI van 90,11 %.

## L. Onderzoek naar de precisie van partij tot partij

Het onderzoek naar de precisie van partij tot partij werd op geblindeerde en gerandomiseerde wijze uitgevoerd. De precisie van partij tot partij werd bepaald op basis van drie onafhankelijk gefabriceerde partijen van het Leica HER2 FISH System - 30 Test die waren geproduceerd op basis van de Good Manufacturing Practice (GMP). Elke partij werd getest op één onderzoekslocatie op 540 eerder als HER2 gekenmerkte TMA-monsters met in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed borstkankerweefsel. Het gebruik van TMA's voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van partij tot partij maakt het mogelijk om gebruik te maken van een groter volume van weefselmonsters met een bredere HER2-expressie.

Uit een telling van de objectglaasjes die werden gekleurd tijdens het onderzoek naar de precisie tussen partijen bleek dat 540 van de 540 geëvalueerde weefselmonsters een concordant resultaat toonden, waarmee de totale concordantie uitkwam op 100 % bij een lagere 95 % CI van 99,45 %.

## Robuustheidsonderzoek

Er werden robuustheidsonderzoeken op het BOND-MAX and BOND-III System uitgevoerd voor het vaststellen van het tolerantiebereik van de analysevoor het bepalen van de tijd en temperatuur van hitteafname, de afnametijd voor enzymen, de temperatuur en concentratie, de denaturatietijd en -temperatuur, de hybridisatietijd- en temperatuur en de stringentie van de spoelingstijd- en temperatuur. Daarnaast werden robuustheidsonderzoeken uitgevoerd op basis van het standaardprotocol voor het BOND-MAX and BOND-III System buiten de aanbevolen grenzen zoals gedefinieerd in het FDA/ORA-richtlijnocument ORA LAB5.3 Rev1.7 voor de temperatuur en vochtigheidsgraad.

- Er werd na vergelijking met de resultaten voor het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test geen verschil in de amplificatiestatus geobserveerd toen de standaardtemperatuur voor elke hitteafhankelijke stap met 4 °C werd verhoogd of verlaagd. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardtemperaturen. Dientengevolge verdienen deze temperaturen aanbeveling.
- Er werd geen verschil geobserveerd in de amplificatiestatus toen het met hitte opgewekte ophalen van (HIER) epitooop werd uitgevoerd gedurende een periode van 20 minuten en 30 minuten bij een temperatuur van 97 °C met de BOND ER1-oplossing, in vergelijking met het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardtijd van 25 minuten. Dientengevolge verdient deze incubatietijd aanbeveling.

- Er werd geen verschil in amplificatiestatus geobserveerd toen het met enzymen opgewekte ophalen van epitoom (EIER) werd uitgevoerd gedurende een periode van 15 minuten en 35 minuten bij een temperatuur van 37 °C, in vergelijking met het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardtijd van 25 minuten. Dientengevolge verdient deze incubatietijd aanbeveling.
- Er werd geen verschil in de amplificatiestatus geobserveerd toen het door enzymen opgewekte ophalen van (EIER) enzymconcentratie werd uitgevoerd met verhoudingen tussen enzymconcentraat/enzymverduunningsmiddel van 1:200 en 1:500 ten opzichte van het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardconcentratie van 1:300. Dientengevolge wordt het gebruik van deze verduunning aanbevolen.
- Er werd in vergelijking met het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test geen verschil in de amplificatiestatus geobserveerd toen de denatura gedurende een periode van 5 minuten en 15 minuten werd uitgevoerd. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardperiode van 10 minuten. Dientengevolge wordt deze denaturatieperiode aanbevolen.
- Er werd geen verschil in amplificatiestatus geobserveerd ten opzichte van het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test toen de hybridisatietijd werd uitgevoerd gedurende een periode van 9 uur en 15 uur. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardperiode van 12 uur. Dientengevolge wordt deze hybridisatietijd aanbevolen.
- Er werd geen verschil in de amplificatiestatus geobserveerd ten opzichte van het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test toen de spoeling na hybridisatie werd uitgevoerd gedurende een periode van 2 minuten, 5 minuten en 7 minuten. De hoogste kwaliteitsbeoordelingen werden verkregen bij de standaardperiode van 4 minuten. Dientengevolge wordt deze spoelingstijd na hybridisatie aanbevolen.
- Er werd geen verschil in de amplificatiestatus geobserveerd doen het Leica HER2 FISH System - 30 Test werd gebruikt op een temperatuur van 28 °C en een relatieve vochtigheidsgraad van 30 % dan wel een temperatuur van 16 °C en een relatieve vochtigheidsgraad van 80 %, ten opzichte van het standaardprotocol voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test dat bij omgevingscondities werd gebruikt.

De werking buiten de voor de geteste verificatiebuustheid werd niet gevalideerd. Het gebruik van elke andere testparameter kan ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

De bovenstaande tekst beschrijft de geteste condities en de onderzoeksresultaten. Hierbij dient te worden opgemerkt dat Leica niet alle mogelijke combinaties van condities heeft getest, en het gebruik van niet-standaard conditiebereiken afraadt. Het standaard Leica HER2 FISH Staining Protocol wordt beschreven in tabel 2.

## Probleemoplossing

Probleem	Mogelijke oorzaak	Herstelactie
Geen of zwak(ke) fluorescent signaal/kleuring	Onjuiste fixatie of verwerking van testmonsters	Zorg ervoor dat er een op formaline gebaseerde fixeerstof wordt gebruikt en dat de verwerkingsschema's geschikt zijn voor de monsters die getest moeten worden.
	Het Leica HER2 FISH System - 30 Test wordt gebruikt buiten de houdbaarheidsdatum	Zorg ervoor dat het Leica HER2 FISH System - 30 Test niet na de uiterste houdbaarheidsdatum wordt gebruikt.
	Onjuiste protocolselectie	Zorg voor een correcte standaardinstelling voor het *FISH Protocol A in het protocolveld kleuring van het dialoogvenster Add slide.
	Onjuiste bulkreagentia toegepast	Zorg ervoor dat alle BOND reagentia toegewezen zijn aan de correcte bulkcontainers en op de juiste posities in het instrument zijn geplaatst.
	Onvoldoende deparaffinesatie van de objectglasjes	Zorg ervoor dat de *Dewax-modus geselecteerd is in het veld Preparation van het dialoogvenster Add slide.
	Onjuiste voorbereiding	Zorg ervoor dat de standaard voorbereidings (HIER en Enzymatic Digestion) protocollen geselecteerd zijn. Pas het voorbereidingsprotocol (HIER of Enzymatic Digestion) aan, indien nodig.
	Ontoereikende denaturatie	Zorg ervoor dat de correcte standaarddenaturatie *D10 geselecteerd is.
	Onvoldoende hybridisatie	Zorg ervoor dat de correcte standaardhybridisatie *H12 geselecteerd is. Verleng de hybridisatietijd, indien nodig.
	Overmatige nahybridisatie spoeling	Verlaag de incubatietijd van de nahybridisatie spoeling.
	Runafgebroken vóór voltooiing	De BOND-software gebruiken: bevestig de aanwezigheid van iedere rapporteerbare fout tijdens de kleuringrun en ga verder zoals door de BOND-software wordt aangegeven.
Verkeerde fluorescente microscoopapparatuur	Zorg ervoor dat alle gebruikte fluorescente microscoopapparatuur geschikt is voor de analyse die uitgevoerd wordt, bevestigen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verkeerde filterset</li> <li>• Verkeerde lamp</li> <li>• Houdbaarheid lamp verstreken</li> <li>• Verkeerd type olie</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geschikte filterset</li> <li>• Geschikte lamp</li> <li>• Goede lichtsterkte</li> <li>• Geschikte immersie-oliegebruiken voor de microscoop</li> </ul>	
Overbelichting door UV-licht (fotobleking)	Sla de objectglasjes in het donker op, vóór en ná assessment, om fluorescente signalen te behouden. Om het signaal voor lange opslag te behouden, dient u de objectglasjes op te slaan bij -20 °C.	



Probleem	Mogelijke oorzaak	Herstelactie
Niet-specifiek(e) fluorescent(e) achtergrondsignaal/ kleuring	Onvoldoende nahybridisatie spoeling	Verhoog incubatietijd nahybridisatie spoeling
	Onjuiste bulkreagentia toegepast	Zorg ervoor dat alle BOND reagentia toegewezen zijn aan de correcte bulkcontainers en op de juiste posities in het instrument zijn geplaatst.
	Onvoldoende deparaffinesatie van de objectglasjes	Zorg ervoor dat de Dewax geselecteerd is in het veld Preparation van het dialoogvenster Add slide.
	Niet-specifieke kruisreactie in gebieden van weefselnecrose	Zorg ervoor dat er een op formaline gebaseerde fixeerstof wordt gebruikt en dat de verwerkingsschema's geschikt zijn voor de monsters die getest moeten worden. Test het monster opnieuw, indien mogelijk, met een ander blok. Als dit niet mogelijk is, bepalen in combinatie met een overeenkomstige H&E gekleurde coupe en gebieden selecteren die de beste fixatiepatronen weergeven.
	Coupes die aan objectglasjes hechten, gebruiken andere hechtmiddelen	Gebruik BOND Plus Slides – productcode S21.2113 of Apex BOND Slides productcode 3800040)
Slecht behoud van de weefselmorfologie	Onvoldoende weefselfixatie en verwerking	Zorg ervoor dat er een op formaline gebaseerde fixeerstof wordt gebruikt en dat de verwerkingsschema's geschikt zijn voor de monsters die getest moeten worden. Test het monster opnieuw, indien mogelijk, met een ander blok. Als dit niet mogelijk is, bepalen in combinatie met een overeenkomstige H&E gekleurde coupe en gebieden selecteren die de beste fixatiepatronen weergeven.
	Onjuiste voorbereiding	Pas het voorbereidingsprotocol (HIER of Enzymatic Digestion) aan.
Weefsel losgeraakt van een of meer patiëntglasjes/ controleglasjes	Het gebruik van verkeerde type objectglasjes of onvoldoende afdruppen van een coupe	Zorg ervoor dat correcte objectglasjes worden gebruikt voor patiënt-/ controlecoupes (bijv. BOND Plus Slides – productcode S21.2113 of Apex BOND Slides productcode 3800040) Zorg ervoor dat de objectglasjes voldoende afgedruipt zijn en 1 uur bij 60 °C geïncubeerd zijn.

Tabel 7. Probleemoplossingsgids voor het Leica HER2 FISH System - 30 Test.

Indien problemen met het Leica HER2 FISH System - 30 Test niet kunnen worden opgelost aan de hand van de informatie in de probleemoplossingsgids kunt u voor hulp contact opnemen met de technische ondersteuning van de dichtstbijzijnde vestiging van Leica Biosystems of zijn distributeur.

## Verwijzingen

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992–1003.
3. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
5. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:7:1049-1056.
6. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *British Journal of Cancer* 1991;63:434-438.
7. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Research* 1990;50:4332-4337.
8. Tandon AK, Clark GM, Chamness AU, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57; 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett, J., Dowsett, M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898: USA
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry*, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.
23. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.

## Licentieovereenkomst

Dit product bevat PathVysion FISH-sondes die geleverd zijn door Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI en CEP zijn merken van Abbott Molecular Inc. Alle rechten voorbehouden. Gebruikt onder licentie.









## Aanpassingen ten opzichte van vorige editie

Meegeleverde componenten, symboolidentificatie.

## Publicatiedatum

28 september 2020

## Identificatie van symbolen

	Batchcode		Opslag		Catalogusnummer
	Medisch apparaat voor diagnostisch gebruik in vitro		Fabrikant	<b>SN</b>	Serienummer
	eFU - raadpleeg instructies voor gebruik		Bevat voldoende materiaal voor <n> tests		Te gebruiken voor JJJJ-MM-DD
<b>R<sub>x</sub> Only</b>	Alleen op recept				

Herceptin is een merk van Genentech, Inc. en F. Hoffmann-La Roche Ltd.