

## **HER2 IQFISH pharmDx**

Code K5731

*HER2 IQFISH pharmDx* is a direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay for quantitative determination of *HER2* gene amplification in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tissue specimens and FFPE specimens from patients with adenocarcinoma of the stomach including gastro-esophageal junction.

The assay is indicated in adjunction to HercepTest™ in the assessment of patients for whom Herceptin™ treatment is being considered.

The kit contains reagents sufficient for 20 tests.

Le test *HER2 IQFISH pharmDx* est un test d'hybridation in situ en fluorescence directe (FISH) pour la détermination quantitative de l'amplification du gène *HER2* dans des échantillons tissulaires de cancer du sein fixés au formol et inclus en paraffine et des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine de patients atteints d'adénocarcinome de l'estomac, y compris de la jonction gastro-oesophagienne.

Ce test est indiqué, en plus du test HercepTest™, pour l'évaluation des patients chez lesquels un traitement par Herceptin™ est envisagé.

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer 20 tests.

*HER2 IQFISH pharmDx* ist ein In-situ-Hybridisierungsassay unter direkter Fluoreszenz (FISH) für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Mammakarzinom-Schnitten und FFPE-Proben von Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs.

Der Assay ist als Ergänzung zum HercepTest™ für die Untersuchung von Patientinnen indiziert, für die eine Behandlung mit Herceptin™ in Erwägung gezogen wird.

Der Kitinhalt ist für 20 Tests ausreichend.

## **Contents/ Sommaire/ Inhalt**

	<b>Page/ Page/ Seite</b>
<b>ENGLISH</b>	
Intended Use .....	8
Summary and Explanation - Breast .....	9
Principle of Procedure - Breast .....	9
Reagents - Breast .....	10
Materials provided .....	10
Materials required but not provided .....	11
Precautions - Breast .....	12
Storage - Breast .....	15
Specimen Preparation - Breast .....	15
Paraffin-embedded sections .....	15
INSTRUCTIONS FOR USE - Breast .....	16
A. Reagent Preparation - Breast .....	16
A.1 Pre-Treatment Solution .....	16
A.2 Stringent Wash Buffer .....	16
A.3 Wash Buffer .....	16
A.4 Ethanol series .....	16
A.5 Pepsin solution .....	16
B. Staining Procedure - Breast .....	17
B.1 Procedural notes .....	17
B.2 Treatment of tissues prior to staining .....	17
B.3 Staining protocol .....	18
Quality Control - Breast .....	21
Interpretation of Staining - Breast .....	21
Limitations - Breast .....	23
Performance Characteristics - Breast .....	23
Analytical sensitivity .....	23
Analytical specificity .....	23
Robustness studies .....	23
Repeatability .....	24
Reproducibility .....	25
Clinical utility .....	25
Troubleshooting - Breast .....	27
Appendix 1 - Breast .....	29
Appendix 2 - Breast .....	31
Appendix 3 - Breast .....	32
Summary and Explanation - Gastric .....	33

Principle of Procedure - Gastric.....	33
Reagents - Gastric.....	34
Materials provided .....	34
Materials required but not provided .....	35
Microscope equipment and accessories .....	35
Precautions - Gastric .....	36
Storage - Gastric .....	39
Specimen Preparation - Gastric .....	39
Paraffin-embedded sections.....	39
INSTRUCTIONS FOR USE - Gastric .....	40
A. Reagent Preparation - Gastric .....	40
A.1 Pre-Treatment Solution.....	40
A.2 Stringent Wash Buffer.....	40
A.3 Wash Buffer .....	40
A.4 Ethanol series .....	40
A.5 Pepsin solution.....	40
B. Staining Procedure - Gastric .....	41
B.1 Procedural notes.....	41
B.2 Treatment of tissues prior to staining .....	41
B.3 Staining protocol .....	42
Quality Control - Gastric .....	45
Interpretation of Staining - Gastric.....	45
Limitations - Gastric.....	47
Performance Characteristics - Gastric.....	48
Analytical sensitivity .....	49
Analytical specificity .....	49
Robustness studies .....	49
Repeatability .....	51
Reproducibility.....	51
Clinical utility .....	51
Troubleshooting - Gastric .....	52
Appendix 4 - Gastric .....	54
Appendix 5 - Gastric .....	56
Appendix 6 - Gastric .....	57
Appendix 7 - Gastric .....	58
References .....	172
Explanation of symbols.....	176

## **FRANÇAIS**

Utilisation prévue .....	59
Résumé et explication – Sein .....	60
Principe de la procédure – Sein .....	60
Réactifs – Sein .....	61
Matériel fourni .....	61
Matériel requis mais non fourni .....	62
Précautions – Sein .....	63
Conservation - Sein .....	67
Préparation des échantillons – Sein .....	67
Coupes incluses en paraffine .....	67
INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Sein .....	68
A. Préparation des réactifs – Sein .....	68
A.1 Solution de prétraitement.....	68
A.2 Tampon de lavage stringent .....	68
A.3 Tampon de lavage .....	68
A.4 Série de bains d'éthanol .....	68
A.5 Solution de pepsine .....	68
B. Procédure de coloration – Sein .....	69
B.1 Remarques sur la procédure .....	69
B.2 Traitement des tissus avant la coloration.....	69
B.3 Protocole de coloration .....	70
Contrôle de qualité – Sein .....	73
Interprétation de la coloration – Sein .....	73
Limitations – Sein .....	75
Caractéristiques de performance – Sein .....	76
Sensibilité analytique.....	76
Spécificité analytique.....	76
Études de robustesse.....	76
Répétabilité .....	77
Reproductibilité .....	77
Utilité clinique .....	78
Dépannage – Sein.....	81
Annexe 1 – Sein .....	83
Annexe 2 – Sein .....	85
Annexe 3 – Sein .....	86
Résumé et explication – Estomac .....	87
Principe de la procédure – Estomac.....	87
Réactifs – Estomac.....	88

Matériel fourni .....	88
Matériel requis mais non fourni .....	89
Microscope et accessoires .....	90
Précautions – Estomac.....	90
Conservation – Estomac .....	94
Préparation des échantillons – Estomac .....	94
Coupes incluses en paraffine .....	94
INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Estomac .....	95
A. Préparation des réactifs – Estomac .....	95
A.1 Solution de prétraitement.....	95
A.2 Tampon de lavage stringent .....	95
A.3 Tampon de lavage .....	95
A.4 Série de bains d'éthanol .....	95
A.5 Solution de pepsine .....	95
B. Procédure de coloration – Estomac .....	95
B.1 Remarques sur la procédure .....	95
B.2 Traitement des tissus avant la coloration.....	96
B.3 Protocole de coloration .....	97
Contrôle de qualité – Estomac .....	100
Interprétation de la coloration – Estomac .....	101
Limitations – Estomac .....	103
Caractéristiques de performance – Estomac.....	104
Contexte : .....	104
Sensibilité analytique.....	105
Spécificité analytique.....	105
Études de robustesse.....	106
Répétabilité .....	107
Reproductibilité .....	107
Utilité clinique .....	107
Dépannage – Estomac .....	109
Annexe 4 – Estomac .....	111
Annexe 5 – Estomac .....	113
Annexe 6 – Estomac .....	114
Annexe 7 – Estomac .....	115
Bibliographie.....	172
Explication des symboles .....	176

## **DEUTSCH**

Verwendungszweck.....	116
Zusammenfassung und Erläuterung – Brustkrebs .....	117
Prinzip des Testverfahrens – Brustkrebs .....	117
Reagenzien – Brustkrebs .....	118
Mitgelieferte Materialien .....	118
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs) .....	119
Vorsichtsmaßnahmen – Brustkrebs.....	120
Lagerung – Brustkrebs .....	123
Probenvorbereitung – Brustkrebs .....	123
Paraffineingebettete Schnitte .....	123
GEBRAUCHSANWEISUNG – Brustkrebs.....	124
A. Vorbereitung der Reagenzien – Brustkrebs .....	124
A.1 Vorbehandlungslösung .....	124
A.2 Stringenzwaschpuffer .....	124
A.3 Waschpuffer.....	124
A.4 Ethanol-Reihe .....	124
A.5 Pepsinlösung .....	124
B. Färbeverfahren – Brustkrebs .....	125
B.1 Verfahrenshinweise .....	125
B.2 Behandlung der Gewebeproben vor dem Färben .....	125
B.3 Färbeprotokoll .....	126
Qualitätskontrolle – Brustkrebs.....	129
Auswertung der Färbeergebnisse – Brustkrebs .....	129
Einschränkungen – Brustkrebs.....	131
Leistungsmerkmale – Brustkrebs .....	132
Analytische Sensitivität.....	132
Analytische Spezifität .....	132
Studien zur Robustheit .....	132
Wiederholbarkeit .....	133
Reproduzierbarkeit.....	133
Klinischer Nutzen .....	134
Fehlersuche – Brustkrebs.....	137
Anhang 1 – Brustkrebs .....	139
Anhang 2 – Brustkrebs .....	141
Anhang 3 – Brustkrebs .....	142
Zusammenfassung und Erläuterung – Magenkarzinom .....	143
Prinzip des Testverfahrens – Magenkarzinom .....	143

Reagenzien – Magenkarzinom .....	144
Mitgelieferte Materialien .....	144
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs) .....	145
Mikroskopausstattungen und -zubehör .....	145
Vorsichtsmaßnahmen – Magenkarzinom .....	146
Aufbewahrung – Magenkrebs.....	149
Probenvorbereitung – Magenkarzinom.....	150
Paraffineingebettete Schnitte .....	150
GEBRAUCHSANWEISUNG – Magenkarzinom .....	150
A. Vorbereitung der Reagenzien – Magenkarzinom .....	150
A.1 Vorbehandlungslösung .....	150
A.2 Stringenzwaschpuffer .....	150
A.3 Waschpuffer.....	151
A.4 Ethanol-Reihe .....	151
A.5 Pepsinlösung .....	151
B. Färbeverfahren – Magenkarzinom .....	151
B.1 Verfahrenshinweise .....	151
B.2 Behandlung der Gewebeproben vor dem Färben.....	152
B.3 Färbeprotokoll .....	152
Qualitätskontrolle – Magenkarzinom .....	156
Auswertung der Färbeergebnisse – Magenkarzinom .....	156
Einschränkungen – Magenkarzinom .....	159
Leistungsmerkmale – Magenkarzinom .....	160
Analytische Sensitivität.....	161
Analytische Spezifität .....	161
Studien zur Robustheit.....	162
Wiederholbarkeit .....	163
Reproduzierbarkeit.....	163
Klinische Nützlichkeit.....	163
Fehlerbehebung – Magenkrebs.....	165
Anhang 4 – Magenkrebs .....	167
Anhang 5 – Magenkrebs .....	169
Anhang 6 – Magenkrebs .....	170
Anhang 7 – Magenkrebs .....	171
Literatur .....	172
Erläuterung der Symbole .....	176

## **ENGLISH**

### **Intended Use**

For in vitro diagnostic use.

*HER2* IQFISH pharmDx is a direct fluorescence in situ hybridization (FISH) assay designed to quantitatively determine *HER2* gene amplification in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) breast cancer tissue specimens and FFPE specimens from patients with adenocarcinoma of the stomach including gastro-esophageal junction.

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

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

Adenocarcinoma of the stomach including gastro-esophageal junction is also referred to as gastric cancer in this document

For breast cancer application, please refer to pages 9-32.

For gastric cancer application, please refer to pages 33-58.

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

## Summary and Explanation - Breast

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

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

Amplification of the *HER2* gene and/or overexpression of its protein have been demonstrated in 25-30% of breast cancers. This up-regulation is associated with poor prognosis, increased risk of recurrence, and shortened survival. Several studies have shown that HER2 status correlates with sensitivity or resistance to certain chemotherapy regimens (10).

Demonstration of high HER2 protein overexpression or *HER2* gene amplification is essential for initiating therapy with Herceptin™, a monoclonal antibody to HER2 protein. Clinical studies have shown that patients whose tumors have high HER2 protein overexpression and/or amplification of the *HER2* gene benefit most from Herceptin™ (11).

## Principle of Procedure - Breast

*HER2* IQFISH pharmDx contains all key reagents required to complete a FISH procedure for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section specimens.

After deparaffinization and rehydration, specimens are heated in Pre-Treatment Solution followed by proteolytic digestion using Pepsin. After the heating and proteolytic pre-treatment steps, this kit employs a non-toxic, ready-to-use IQISH Probe Mix based on a combination of PNA (peptide nucleic acid) (12) and DNA technology. This Probe Mix consists of a mixture of Texas Red-labelled DNA probes covering a 218 kb region including the *HER2* gene on chromosome 17, and a mixture of fluorescein-labelled PNA probes targeted at the centromeric region of chromosome 17 (CEN-17). The specific hybridization to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each *HER2* gene locus and a distinct green fluorescent signal at each chromosome 17 centromere. After a stringent wash, the specimens are mounted with Fluorescence Mounting Medium containing DAPI and coverslipped. Using a fluorescence microscope equipped with appropriate filters (see Appendix 3), tumor cells are located, and enumeration of the red (*HER2*) and green (CEN-17) signals is conducted. Then the *HER2*/CEN-17 ratio is calculated. Normal cells in the analyzed tissue section will serve as an internal positive control of pre-treatment and hybridization efficiency. For details see the Interpretation of Staining section.

For interactive e-learning please use the *HER2* IQFISH pharmDx e-learning program designed to supply laboratory technicians, pathologists and scientists with an accurate and fast knowledge of how to achieve optimal results using *HER2* IQFISH pharmDx:  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Reagents - Breast

### Materials provided

The materials listed below are sufficient for 20 tests (a test is defined as one 22 mm x 22 mm target area). The number of tests is based on the use of 250 µL per slide of Vial 2A (5-8 drops), 10 µL per slide of Vial 3, and 15 µL per slide of Vial 5. The solutions in Vial 3 and Vial 5 are viscous and may have to be centrifuged shortly in a microcentrifuge in order to collect all of the provided reagent.

The kit provides materials sufficient for 10 individual staining runs (four separate runs, when using the pepsin immersing method). *HER2* IQFISH pharmDx is shipped on dry ice. **To ensure that kit components have not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.** Note that some kit components may remain unfrozen, this will not affect the performance of *HER2* IQFISH pharmDx.

#### Vial 1

**PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)**

**Pre-Treatment Solution (20x)**

150 mL, concentrated 20x

MES (2-[*N*-morpholino]ethanesulphonic acid) buffer.

#### Vial 2A

**PEPSIN**

**Pepsin**

4 x 6.0 mL, ready-to-use

Pepsin solution, pH 2.0; contains stabilizer and an antimicrobial agent.

#### Vial 2B

**PEPSIN DILUENT (10x)**

**Pepsin Diluent (10x)**

24 mL, concentrated 10x

Dilution buffer, pH 2.0; contains an antimicrobial agent.

#### Vial 3

**HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX**

**HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix**

0.2 mL, ready-to-use

Mix of Texas Red-labelled *HER2* DNA probes and fluorescein-labelled CEN-17 PNA probes; supplied in IQISH hybridization buffer.

#### Vial 4

**STRINGENT WASH BUFFER (20x)**

**Stringent Wash Buffer (20x)**

150 mL, concentrated 20x

SSC (saline-sodium citrate) buffer with detergent (Tween-20).

#### Vial 5

**FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM**

**Fluorescence Mounting Medium**

0.4 mL, ready-to-use

Fluorescence mounting medium with 500 µg/L DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

#### Vial 6

**WASH BUFFER (20x)**

**Wash Buffer (20x)**

500 mL, concentrated 20x

Tris/HCl buffer.

**COVERSHEET SEALANT****Coverslip Sealant**

1 tube, ready-to-use

Solution for removable sealing of coverslips.

**NOTE:** The following kit reagents: Pre-Treatment Solution (20x), Pepsin, Pepsin Diluent (10x), Stringent Wash Buffer (20x), Fluorescence Mounting Medium, Wash Buffer (20x) and Coverslip Sealant are interchangeable with the corresponding reagents in Dako Histology FISH Accessory Kit, Code K5799.

**Materials required but not provided****Laboratory reagents**

Distilled or deionized water

Ethanol, 96%

Xylene or xylene substitutes

**Laboratory equipment**

Absorbent wipes

Adjustable pipettes

Calibrated partial immersion thermometer (range 37-100 °C)

Calibrated surface thermometer (range 37-100 °C)

Coverslips (22 mm x 22 mm)

Forceps

Fume hood

Heating block or hybridization oven\*

Humid hybridization chamber\*

Microcentrifuge

Slides, Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides (see Specimen Preparation)

Staining jars or baths

Timer (capable of 2–15 minute intervals)

Vortex mixer

Water bath with lid (capable of maintaining 37(±2) °C, 63 (±2) °C and from 95 °C to 99 °C)

Microwave oven with sensing capability if pre-treatment is performed using microwave oven  
(see B3. Staining protocol. Step 1: Pre-treatment, Method B)

\* Instrumentation that allows for conditions identical to the ones described may be used for denaturation and hybridization.

**Microscope equipment and accessories**

Filters for fluorescence microscope: DAPI and FITC/Texas Red double filter, or FITC and Texas Red mono filters - see Appendix 3 for details

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

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

## Precautions - Breast

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. Stringent Wash Buffer (20x), is labeled: Safety data sheet available on request.
4. Pepsin is labeled:



### Danger

Contains: reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H314	Causes severe skin burns and eye damage.
H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.
P304 + P340 + P310	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P301 + P310 + P331	IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or physician. Do NOT induce vomiting.
P303 + P361 + P353 + P310	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P305 + P310	IF IN EYES: Immediately call a POISON CENTER or physician.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

5. Pepsin Diluent (10x) is labeled:



### Danger

Contains: reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H225	Highly flammable liquid and vapour.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
H317	May cause an allergic skin reaction.
H336	May cause drowsiness or dizziness.
H412	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P280	Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.
P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P273	Avoid release to the environment.
P304 + P340 + P310	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P301 + P310 + P331	IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or physician. Do NOT induce vomiting.
P303 + P361 + P353 + P310	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P305 + P310	IF IN EYES: Immediately call a POISON CENTER or physician.
P405	Store locked up.

P501 Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

6. HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix is labeled:



**Warning**

Contains: Dextran sulfate sodium, ethylene carbonate

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

H335 May cause respiratory irritation.

H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

P280 Wear protective gloves. Wear eye or face protection.

P260 Do not breathe vapor.

P304 + P340 + P312 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER or physician if you feel unwell.

P405 Store locked up.

P501 Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

7. Wash Buffer (20x) is labeled:



**Warning**

H315 Causes skin irritation.

H319 Causes serious eye irritation.

P280 Wear protective gloves. Wear eye or face protection.

P264 Wash hands thoroughly after handling.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

8. Coverslip Sealant is labeled:



**Danger**

Contains: Naphtha (petroleum), hydrotreated light

H225 Highly flammable liquid and vapour.

H315 Causes skin irritation.

H336 May cause drowsiness or dizziness.

H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

P280 Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.

P210 Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.

P241 Use explosion-proof electrical, ventilating, lighting and all material-handling equipment.

P240 Ground and bond container and receiving equipment.

P273 Avoid release to the environment.

P304 + P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P303 + P361 + P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.

- 
- |      |   |
|------|---|
| P235 | Keep cool.  |
| P501 | Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations. |
9. Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and should be disposed of with proper precautions (13). Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
  10. Minimize microbial contamination of reagents to avoid erroneous results.
  11. Incubation times and temperatures, or methods other than those specified, may give erroneous results.
  12. Tissue fixation methods and thickness of specimen other than those specified may affect tissue morphology and/or signal intensity.
  13. Avoid evaporation of *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* during hybridization by ensuring sufficient humidity in the hybridization chamber.
  14. Reagents have been optimally diluted. Further dilution may result in loss of performance.
  15. Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin.
  16. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
  17. Safety Data Sheets are available on [www.agilent.com](http://www.agilent.com) or on request.
  18. As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet (SDS) for additional information.
  19. Only clean staining jars should be used for pepsin immersion method (Step 2, method C).

## **Storage - Breast**

Store the *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* (Vial 3) at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  in the dark. All other reagents can be stored at  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$  in the dark. All reagents tolerate frozen storage. Freezing and thawing the reagents for up to 10 times does not affect performance.

Pepsin, *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix*, and Fluorescence Mounting Medium (Vials 2A, 3 and 5) may be affected adversely if exposed to heat. Do not leave these components at room temperature.

*HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* and Fluorescence Mounting Medium (Vials 3 and 5) may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store these components or perform analysis in strong light, such as direct sunlight.

Do not use the kit after the expiration date stamped on the kit box. If reagents are stored under conditions other than those specified in this package insert, the user must validate reagent performance (14).

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

## **Specimen Preparation - Breast**

Specimens from biopsies, excisions or resections must be handled to preserve the tissue for FISH analysis. Standard methods of tissue processing for immunocytochemical staining should be used for all specimens (15).

### **Paraffin-embedded sections**

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

Tissue specimens should be cut into sections of 4-6  $\mu\text{m}$ .

The slides required for *HER2* gene amplification analysis and verification of tumor presence should be prepared at the same time. A minimum of 2 serial sections is recommended, 1 section for tumor presence stained with hematoxylin and eosin (H&E stain), and 1 section for *HER2* gene amplification analysis. It is recommended that tissue sections are mounted on Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides. Specimens should be analyzed within 4-6 months of sectioning when stored at room temperature ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ).

---

## INSTRUCTIONS FOR USE - Breast

### A. Reagent Preparation - Breast

It is convenient to prepare the following reagents prior to staining:

#### **A.1 Pre-Treatment Solution**

Crystals may occur in Vial 1, but they will dissolve at room temperature. Ensure that no crystals are present before preparation of reagent.

Dilute a sufficient quantity of Vial 1 (Pre-Treatment Solution 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted solution if cloudy in appearance.

#### **A.2 Stringent Wash Buffer**

Dilute a sufficient quantity of Vial 4 (Stringent Wash Buffer 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted buffer may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted buffer if cloudy in appearance.

#### **A.3 Wash Buffer**

Dilute a sufficient quantity of Vial 6 (Wash Buffer 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted buffer may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted buffer if cloudy in appearance.

#### **A.4 Ethanol series**

From a 96% ethanol solution, prepare 3 jars with 70%, 85%, and 96% ethanol, respectively. Store covered jars at room temperature or at 2-8 °C, and use for a maximum of 200 slides. Discard solutions if cloudy in appearance.

#### **A.5 Pepsin solution**

A pepsin solution is only needed when using the pepsin immersing method (Method C).

Prepare pepsin solution as follows;

For a six slide capacity container prepare 60 mL pepsin solution:

Add 48 mL of room temperature (20-25 °C) distilled or deionized water to the container.

Add 6 mL of cold (2-8 °C) Pepsin Diluent (10x) (Vial 2B) to the container.

Add 6 mL of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to the container.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath.

For a 24 slide capacity container prepare 240 mL pepsin solution:

Add 192 mL of room temperature (20-25 °C) distilled or deionized water to the container.

Add 24 mL of cold (2-8 °C) Pepsin Diluent (10x) (Vial 2B) to the container.

Add 24 mL of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to the container.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath.

Equilibrated pepsin solution should be used within 5 hours.

## B. Staining Procedure - Breast

### B.1 Procedural notes

The user should read these instructions carefully and become familiar with all components prior to use (see Precautions).

All reagents should be equilibrated to the relevant temperature prior to use as follows:

**Vial 1:** The diluted Pre-Treatment Solution should be equilibrated to **95-99 °C** if water bath is used for pre-treatment (B3. Staining protocol, Step 1: Pre-Treatment, Method A). If microwave oven with sensing capability is used for pre-treatment (B3. Staining protocol, Step 1: Pre-Treatment, Method B) the diluted Pre-Treatment Solution should be equilibrated to room temperature 20-25 °C.

**Vial 2A:** Pepsin should be applied at **2-8 °C** (B3, Staining protocol, Step 2: Method A and B) and kept cold continuously.

**Vial 2B:** Pepsin Diluent (10x) should be applied at **2-8 °C** (B3, Staining protocol, Step 2: Method C).

**Vial 3:** HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix separates into two phases while stored at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Prior to use of Vial 3 ensure that only one phase is present by equilibrating the probe mix to room temperature (**20-25 °C**) followed by mixing. Thaw Vial 3 at room temperature (20-25 °C) for a maximum of 30 minutes (protect from strong light), then thoroughly whirl the vial for 15 seconds at 2500 rpm using a vortex mixer. Store Vial 3 at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  immediately after use.

**Vial 4:** Diluted Stringent Wash Buffer; one jar should be equilibrated to room temperature, another jar should be equilibrated to **63 ( $\pm 2$ ) °C** prior to use.

**Vial 5:** Fluorescence Mounting Medium may be applied at any temperature from **2-25 °C**.

**Vial 6:** The Diluted Wash Buffer should be equilibrated to room temperature **20-25 °C**.

**Coverslip Sealant** may be applied at any temperature from **2-25 °C**.

### All steps must be performed at the outlined temperature.

The procedure includes a number of dehydrations followed by drying of the tissue sections. Ensure that tissue sections are completely dry before proceeding to the next step. Do not allow tissue sections to dry during the other procedural steps.

If the staining procedure has to be interrupted, slides may be kept in Wash Buffer after the deparaffinization step for up to 1 hour at room temperature (20-25 °C) without affecting the results.

### B.2 Treatment of tissues prior to staining

**Deparaffinization and rehydration:** Prior to performing the analysis, tissue slides must be deparaffinized to remove embedding medium and rehydrated. Avoid incomplete removal of paraffin. Residual embedding medium will result in increased non-specific staining. This step should be performed at room temperature (20-25 °C).

1. Place slides in a xylene bath and incubate for 5 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
2. Tap off excess liquid and place slides in 96% ethanol for 2 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
3. Tap off excess liquid and place slides in 70% ethanol for 2 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
4. Tap off excess liquid and place slides in diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for a minimum of 2 minutes. Commence staining procedure as outlined in Section B.3, Step 1, Pre-Treatment.

Xylene and alcohol solutions should be changed after 200 slides or less.

Xylene substitutes may be used.

**NOTE:** The reagents and instructions supplied in this kit have been designed for optimal performance. Further dilution of the reagents or alteration of incubation temperatures may give erroneous or discordant results. Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may invalidate the assay results.

**B.3 Staining protocol****Step 1: Pre-Treatment**

Pre-treatment can be performed either by using water bath as described in method A) or, alternatively, by use of microwave oven with sensing capability as described in method B).

**Method A: Pre-treatment using water bath**

Fill staining jars, e.g. Coplin jars, with the diluted Pre-Treatment Solution (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.1). Place staining jars containing diluted Pre-Treatment Solution in water bath. Heat water bath and the Pre-Treatment Solution to 95-99 °C. Measure temperature inside jar with a calibrated thermometer to ensure correct temperature. Cover jars with lids in order to stabilize the temperature and avoid evaporation.

Immerse the room temperature deparaffinized sections into the preheated Pre-Treatment Solution in the staining jars. Re-check temperature and incubate for 10 ( $\pm 1$ ) minutes at 95-99 °C.

Remove the entire jar with slides from the water bath. Remove lid and allow the slides to cool in the Pre-Treatment Solution for 15 minutes at room temperature.

Transfer the slides to a jar with diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

**NOTE:** The Pre-Treatment Solution is designed for single use application only. Do not re-use.

**Method B: Pre-treatment using microwave oven with sensing capability**

Fill a plastic jar with diluted room temperature (20-25 °C) Pre-Treatment Solution. Immerse the deparaffinized sections in Pre-Treatment Solution, cover the jar with a punctured lid and place it in the microwave oven. Select the boiling sensor function and a program that runs for 10 minutes after boiling temperature has been reached\*.

Following the 10 minutes incubation take the jar with slides out of the oven, remove the lid and cool for 15 minutes at room temperature. Transfer the slides to a jar with diluted Wash Buffer and soak for 3 minutes at room temperature (20-25 °C). Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

\* The use of a microwave oven with a sensing capability means that the oven must include a sensor and programs which initially heat the Pre-Treatment Solution to the boiling point and subsequently maintain the required pre-treatment temperature (above 95 °C) while counting down the preset time (10 ( $\pm 1$ ) minutes). Some microwave oven models with sensing capability may not include the possibility to freely set a count-down time. If the model only includes pre-set programs, be sure to select a program which maintains the required pre-treatment temperature (above 95 °C) for at least 10 ( $\pm 1$ ) minutes and manually stop the program after 10 ( $\pm 1$ ) minutes.

**NOTE:** The Pre-Treatment Solution is designed for a single use application only. Do not re-use.

**Step 2: Pepsin, ready-to-use (RTU) or pepsin solution**

Pepsin incubation can be performed by direct application of RTU pepsin drops to the slides either at room temperature (20-25 °C) (Method A) or at 37 °C (Method B). Alternatively, slides can be immersed into a pepsin solution and incubated at 37 ( $\pm 2$ ) °C (Method C).

**Method A and Method B:**

Tap off excess buffer. Using lintless tissue (such as an absorbent wipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area.

Apply 5-8 drops (250 µL) of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to cover specimen. Always store Pepsin at 2-8 °C.

**Method A: Pepsin, RTU - Incubation at 20-25 °C**

Incubate for 5-15 minutes at room temperature (20-25 °C). An incubation time of 5-15 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess Pepsin and soak sections in the diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace diluted Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

**Method B: Pepsin, RTU - Incubation at 37 °C**

Place specimen with Pepsin on a heating block at 37 °C and incubate for 3-5 minutes. An incubation time of 3-5 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess Pepsin and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to air dry completely.

**Method C: Pepsin solution - Immersion of slides into 37 °C pepsin solution**

The kit contains reagents sufficient for four separate runs (60 mL pepsin solution, small container for six slides) or a single run (240 mL pepsin solution, large container for 24 slides). Prepare the pepsin solution as described in section A.5.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath. Ensure that the temperature has stabilized. Measure temperature inside the container with a calibrated thermometer to ensure correct temperature.

Tap off excess wash buffer. Immerse slides into the 37 ( $\pm 2$ ) °C pepsin solution and incubate for 20-30 minutes. An incubation time of 20-30 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess pepsin solution and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to air dry completely.

**Step 3: HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix**

HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix separates into two phases while stored at  $\leq -18$  °C. Prior to use of Vial 3 ensure that only one phase is present by equilibrating the probe mix to room temperature (20-25 °C) followed by mixing. Thaw Vial 3 at room temperature (20-25 °C) for a maximum of 30 minutes (protect from strong light), then thoroughly whirl the vial for 15 seconds at 2500 rpm using a vortex mixer. Store Vial 3 at  $\leq -18$  °C immediately after use. Apply 10  $\mu$ L of HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix (Vial 3) to the centre of the tissue section. Immediately place a 22 mm x 22 mm glass coverslip over the Probe Mix and allow it to spread evenly under the coverslip. Avoid air bubbles. If air bubbles are observed, gently tap them away from the tissue using forceps.

**Remember to store Vial 3 at  $\leq -18$  °C immediately after use.**

Seal coverslip with Coverslip Sealant by ejecting the Sealant around the periphery of the coverslip. Allow the Coverslip Sealant to overlap the coverslip and the slide, thereby forming a seal around the coverslip. Make sure that the Coverslip Sealant covers the entire edge of the coverslip.

Place slides on a flat metal or stone surface (heating block or on a block in a hybridization oven) preheated to 66 ( $\pm 1$ ) °C. Denature for exactly 10 minutes. Place slides in a preheated humidified hybridization chamber. Cover the chamber with a lid and incubate at 45 ( $\pm 2$ ) °C for 60-120 minutes\*. Please note that a hybridization temperature of 37 °C is not suitable for use with the probes contained within this kit.

\* Instrumentation that allows for conditions identical to the ones described above may be used for denaturation and hybridization.

#### **Step 4: Stringent Wash**

Fill two staining jars, e.g. Coplin jars, with the diluted Stringent Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.2). A minimum volume of 100 mL or 15 mL per slide in each jar is recommended.

Place one of the staining jars containing diluted Stringent Wash Buffer at room temperature in a fume hood and the other in a water bath. Heat water bath and the diluted Stringent Wash Buffer to 63 ( $\pm 2$ ) °C. Ensure that the temperature has stabilized. Cover jar with lid in order to stabilize the temperature and avoid evaporation. Measure temperature inside the water bath jar with a calibrated thermometer to ensure correct temperature. The Stringent Wash Buffer contains detergent and may become turbid at 63 °C; this will not affect performance.

Using forceps or gloves take slides from the hybridization chamber and gently remove Coverslip Sealant as well as coverslip and place slides in the room temperature pre-wash jar, one at a time.

As soon as all coverslips have been removed, transfer slides from the room temperature, pre-wash jar to the 63 ( $\pm 2$ ) °C jar in the water bath.

Immediately after transferring the slides into the 63 ( $\pm 2$ ) °C diluted Stringent Wash Buffer in the water bath, the timer should be started. Perform stringent wash for exactly 10 minutes.

Remove slides from the diluted Stringent Wash Buffer, and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Change diluted Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to dry completely.

#### **Step 5: Mounting**

Apply 15 µL of Fluorescence Mounting Medium containing DAPI (Vial 5) to the target area of the slide and apply a glass coverslip.

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

## **Quality Control - Breast**

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

## **Interpretation of Staining - Breast**

### **Assessable tissue**

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

**Signal enumeration:** Locate the tumor within the context of the H&E stained slide and evaluate the same area on the FISH stained slide. Scan several areas of tumor cells to account for possible heterogeneity. Select an area having good nuclei distribution. Begin analysis in the upper left quadrant of the selected area and, scanning from left to right, count the number of signals within the nuclear boundary of each evaluated nucleus according to the guidelines below (see also Appendix 3).

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

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

### Signal counting guide

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

Record counts in a table as shown in Appendix 2.

Count 20 nuclei per tissue specimen, when possible from distinct tumor areas (17).

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

Specimens with a *HER2/CEN-17* ratio above or equal to 2 should be considered *HER2* gene amplified (5, 17-19).

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

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

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

## **Limitations - Breast**

1. FISH is a multi-step process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, as well as in tissue selection, fixation, and processing, preparation of the FISH slide, and interpretation of the staining results.
2. FISH results are dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may influence on probe hybridization. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.
3. For optimal and reproducible results, the tissue slides must be deparaffinized completely. The paraffin removal needs to be completed at the beginning of the staining process. (See INSTRUCTIONS FOR USE, section B.2).
4. Only temperature-calibrated water bath, heating block, and hybridization oven should used. Use of other types of equipment may result in evaporation of *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* during hybridization and must be validated by user.

## **Performance Characteristics - Breast**

### **Analytical sensitivity**

The sensitivity of the *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* was investigated using 18 specimens of normal human breast epithelium. The ratio between the number of *HER2* signals and CEN-17 signals was calculated based on a counting of 20 nuclei per specimen.

*HER2/CEN-17* ratio for the 18 specimens of normal human breast epithelium was between 0.97-1.08.

### **Analytical specificity**

The *HER2* DNA probes in the *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* have been end-sequenced and mapped to confirm a total coverage of 218 kb including the *HER2* gene.

The CEN-17 PNA probes in the *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* have been tested individually and in combination to confirm their specific hybridization to the centromeric region of chromosome 17.

To measure the assay's ability to solely identify the target substances *HER2* and CEN-17 without interference from other substances, studies were performed on tissue specimens of normal human breast epithelium using Vial 3 containing the hybridization buffer but without the probe mix. A total of 18 specimens were evaluated for presence of signals not related to the probe mix. No detection of other chromosome targets or interference with closely related substances was observed in any of the 18 specimens.

### **Robustness studies**

The robustness of the *HER2 IQFISH pharmDx assay* was tested by varying pre-treatment time, temperature, and methods for heating of pre-treatment buffer (microwave oven or water bath), pepsin incubation time and method (RTU pepsin or immersion), denaturation temperature and time, hybridization time, and stringent wash time and temperature.

No significant difference in results was observed at the following experimental conditions:

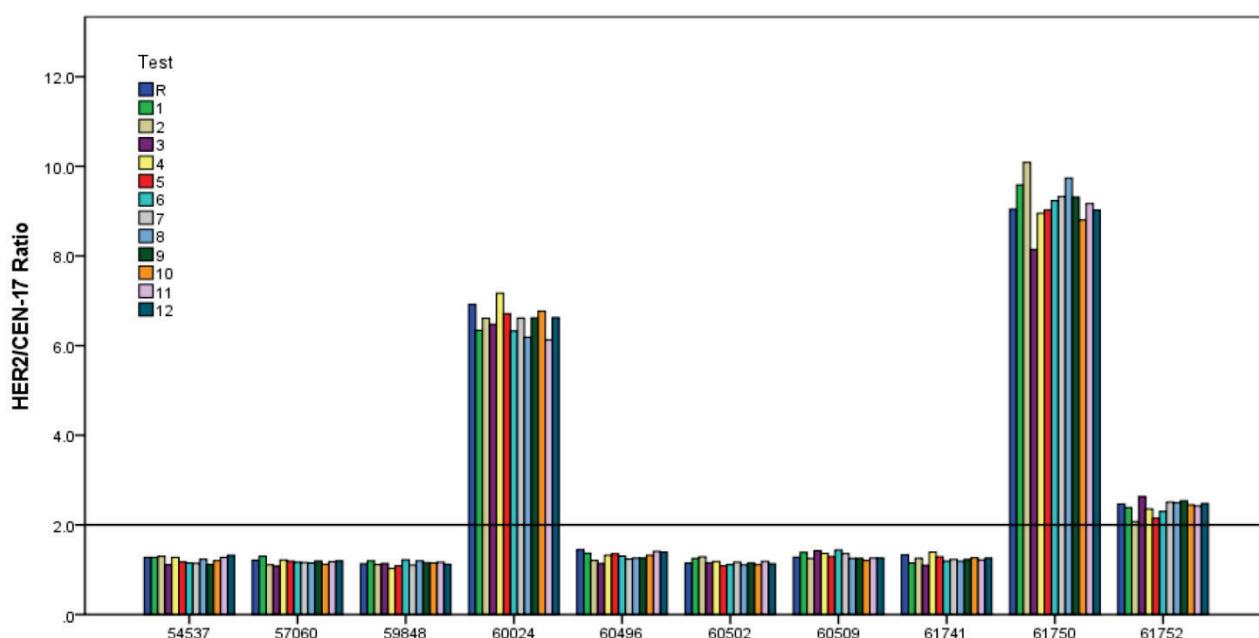
- Pretreatment Method A) Water bath for 10 minutes combined with each of the temperatures 95 °C, 95-99 °C, and 99 °C together with 9, 10 and 11 minutes at 95-99 °C.
- Pretreatment Method B) Microwave oven for 9, 10, and 11 minutes at >95 °C.
- Pepsin digestion Method A) with incubation times of 5, 10, and 15 minutes at room temperature (20-25 °C).
- Pepsin digestion Method B) with incubation times of 3, 4, and 5 minutes at 37 °C.
- Pepsin digestion Method C) with incubation times of 20, 25, and 30 minutes combined with each of the temperatures 35, 37, and 39 °C.

- Denaturation for 10 minutes combined with each of the temperatures 65, 66, and 67 °C together with 9, 10, and 11 minutes at 66 °C. Hybridization time of 60, 90, and 120 minutes at 45 °C.
- Stringent wash for 10 minutes combined with each of the temperatures 61, 63, and 65 °C together with 9, 10, and 11 minutes at 63 °C.

**Note:** For the robustness tests only one parameter in the staining procedure was changed at a time while all other parameters were kept constant. It is recommended to adhere to the time and temperatures indicated in the staining procedure.

Hybridization for 60 minutes gave high signal intensity though slightly reduced compared with 90 and 120 minutes hybridization. No significant difference in results was observed at the other time/temperature combinations.

The staining procedure for *HER2* IQFISH pharmDx offers protocol variables for heat pre-treatment, pepsin digestion and hybridization time. Each unique combinatorial option has been validated with regard to *HER2* gene status. Validation was performed on 10 FFPE human breast carcinoma specimens for each of the 12 possible combinatorial options. *HER2* FISH pharmDx Kit (K5331) was used as reference. *HER2/CEN-17* ratio for each individual specimen is shown in Figure 1. Cross tabulations between the 12 tests and the reference staining showed overall agreement in *HER2* gene status of 100% (10/10) with lower and upper two-tailed 95% confidence limits at 78.3% and 100%, respectively. Kappa value was 1.00 and McNemars test showed absence of bias (two-tailed p-value of 1.00).



**Figure 1.** Individual *HER2/CEN-17* ratios for 10 human breast carcinoma specimens stained using the 12 combinatorial protocol variations possible with *HER2* IQFISH pharmDx (Code K5731) (Test 1-12) and the *HER2* FISH pharmDx Kit (Code K5331) reference (R). The horizontal line illustrates the cut-off value of 2.0.

### Repeatability

The repeatability of the *HER2/CEN-17* ratio was investigated with the *HER2* IQFISH pharmDx assay using consecutive sections of nine human breast carcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Triplicate sections of each specimen were tested in the same run. The average coefficient of variation was 5.2% for non-amplified specimens (range from 1% to 8%) and 14% for amplified specimens (range from 7% to 20%).

A total of five consecutive sections of four human breast carcinoma specimens with different thickness (3, 4, 5, 6, and 7 µm) were tested with *HER2* IQFISH pharmDx. The average coefficient of variation of the *HER2/CEN-17* ratio was 7% (range from 6% to 9%).

### **Reproducibility**

The *HER2* IQFISH pharmDx assay was tested for lot-to-lot and observer-to-observer reproducibility using three lots of *HER2* IQFISH pharmDx and three observers. Reproducibility was tested on nine different human breast carcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status.

The average coefficient of variation for lot-to-lot reproducibility was 5% for non-amplified specimens (range from 2% to 8%) and 7.8% for amplified specimens (range from 5% to 11%).

The average coefficient of variation for observer-to-observer reproducibility was 3.2% for non-amplified specimens (range from 0.2% to 6%) and 2.8% for amplified specimens (range from 2% to 4%).

### **Clinical utility**

The clinical utility of the Dako *HER2* FISH pharmDx Kit (Code K5331) was investigated in a comparative study with the Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit. The study included 150 archived specimens from patients that had either node-positive or node-negative, grade II-III breast cancer.

The primary objective of the study was to investigate the degree of concordance between the *HER2*/chromosome 17 centromere ratios for the 150 specimens as tested with the Dako and Vysis kits, both regarding the general agreement of the ratios and the agreement of the dichotomized FISH results (+/- groups).

A total of 145 specimens were successfully hybridized and scored, and were thereby eligible for statistical analysis. A 2 x 2 cross tabulation of the results is presented in Table 1.

**Table 1. Dichotomized results from 145 breast cancer specimens tested with Dako *HER2* FISH pharmDx Kit and Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit. 60 nuclei in each specimen were scored with each of the two kits.**

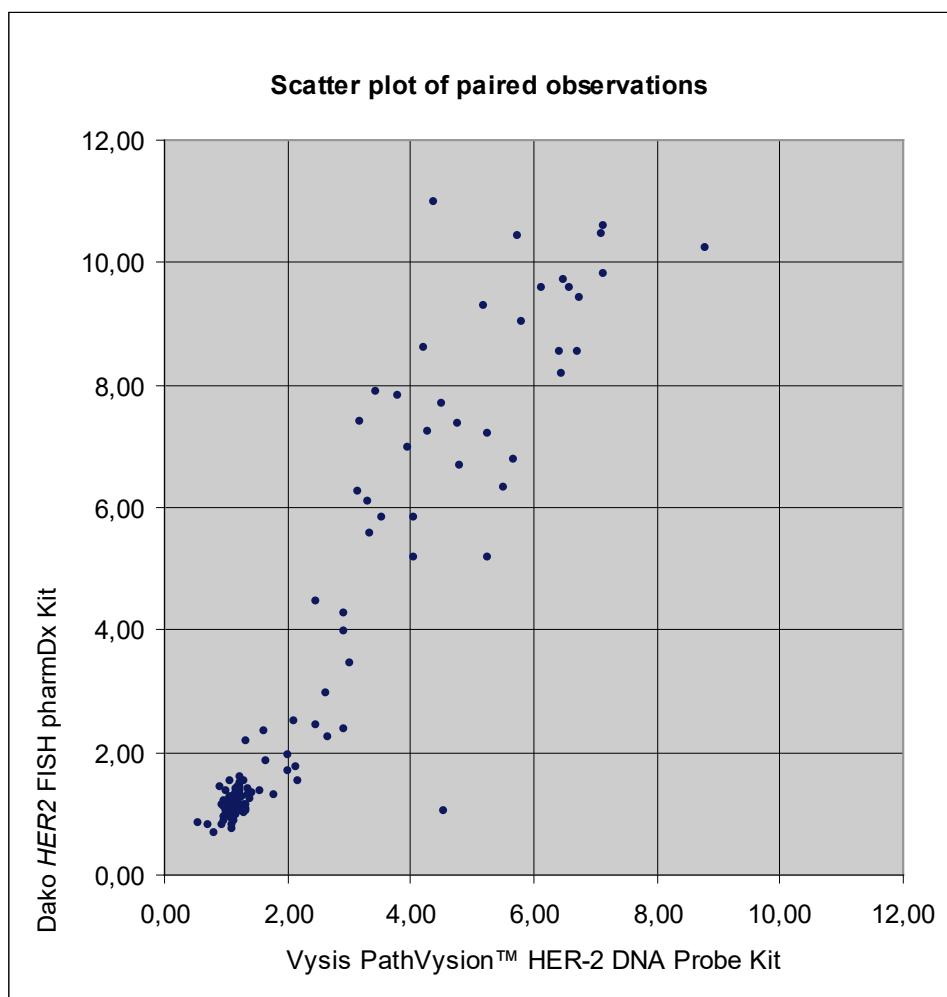
	Dako Kit (-) amplified	Dako Kit (+) amplified	Sum
<b>Vysis Kit (-) amplified</b>	95	2	97
<b>Vysis Kit (+) amplified</b>	5	43	48
<b>Sum</b>	100	45	145

The concordance between the Dako and Vysis tests was 95% with a confidence interval of 92-99%. The kappa value was 0.89.

McNemars test for systematic bias between the two tests was not significant ( $p=0.22$ ).

Figure 2 shows a scatter plot of the paired observations for the 145 specimens.

**Figure 2.** 145 breast cancer specimens tested for *HER2* gene amplification using Dako *HER2* FISH pharmDx Kit and Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit. Results are expressed as *HER2*/chromosome 17 centromere ratios. 60 nuclei in each specimen were scored with each of the two kits.



The general agreement between Dako *HER2* FISH pharmDx and Vysis PathVysion™ *HER-2* DNA Probe tests was investigated using analysis of the difference between paired observations of log (ratio), and a linear regression analysis of log (ratio) of the two tests. It was concluded that the difference between paired observations of log (ratio) is systematically increasing by the sum of the *HER2*/chromosome 17 centromere ratios, and that for higher ratios the measured ratio is higher in the Dako test than in the Vysis test.

The higher *HER2*/chromosome 17 centromere ratio observed with the Dako *HER2* FISH pharmDx Kit can be related to a true difference between the two tests, e.g. that a higher resolution of the Dako *HER2* FISH pharmDx Kit, results in higher ratios for highly *HER2* gene amplified cases. However, the testing of the kits was performed at 2 different sites and variation between laboratories is expected. Moreover, a higher variation for highly amplified cases has been reported in the literature, but it is considered not to be clinically relevant (18). The current study does not allow for investigation of a systematic difference between the two tests across multiple laboratories. It should be added that the observed variation between the two tests is of a similar size as the variation between sites observed in the Portability Study.

Dako *HER2* IQFISH pharmDx (Code K5731) has been compared with Dako *HER2* FISH pharmDx Kit (Code K5331) in a comparative study on 78 breast tissue specimens of human breast carcinoma. Cross tabulation of *HER2* status obtained by the two assays gave an overall agreement of 98.7% with lower and upper limits for the 95% confidence interval at 94.2% and 99.9%. The Kappa value was 0.96 with lower and upper limits for the 95% confidence interval at 0.89 and 1.00. The p-value for McNemars test was 1.00 indicating absence of bias between the two assays.

## Troubleshooting - Breast

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No signals or weak signals	1a. Kit has been exposed to high temperatures during transport or storage 1b. Microscope not functioning properly <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inappropriate filter set</li> <li>- Improper lamp</li> <li>- Mercury lamp too old</li> <li>- Dirty and/or cracked collector lenses</li> <li>- Unsuitable immersion oil</li> </ul> 1c. Faded signals 1d. Pre-treatment conditions incorrect 1e. Evaporation of Probe Mix during hybridization	1a. Check storage conditions. Ensure that dry ice was present when the consignment was received. Ensure that vial 3 has been stored at ≤ -18 °C in the dark. Ensure that vials 2A and 5 have been stored at maximum 2–8 °C in the dark. 1b. Check the microscope and ensure that the used filters are suitable for use with the kit fluorochromes, and that the mercury lamp is correct and has not been used beyond expected lifetime. (see Appendix 3). In case of doubt, please contact your local microscope vendor. 1c. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light sources. 1d. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used 1e. Ensure sufficient humidity in the hybridization chamber
2. No green signals	2a. Stringent wash conditions incorrect	2a. Ensure that the recommended stringent wash temperature and time are used, and that coverslips are removed before performing stringent wash
3. No red signals	3a. Pre-treatment conditions incorrect	3a. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used
4. Areas without signal	4a. Probe volume too small 4b. Air bubbles caught during Probe Mix application or mounting	4a. Ensure that the probe volume is large enough to cover the area under the coverslip 4b. Avoid air bubbles. If observed, gently tap them away using forceps
5. Excessive back-ground staining	5a. Inappropriate tissue fixation	5a. Ensure that only formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are used

Problem	Probable Cause	Suggested Action
	5b. Paraffin incompletely removed 5c. Stringent wash temperature too low 5d. Prolonged exposure of hybridized section to strong light	5b. Follow the deparaffinization and rehydration procedures outlined in Section B.2 5c. Ensure that the stringent wash temperature is 63 ( $\pm 2$ ) °C 5d. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light
6. Poor tissue morphology	6a. Incorrect Pepsin treatment  6b. Incorrect pre-treatment conditions may result in unclear or cloudy appearance  6c. Too long Pepsin treatment or very thin section thickness may cause ghost cells or donut cells to appear.	6a. Adhere to recommended Pepsin incubation times. See section B.3, step 2. Ensure that the Pepsin is handled at the correct temperature. See Section B.1  6b. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used  6c. Shorten the Pepsin incubation time. See section B.3, step 2. Ensure that the section thickness is 4-6 $\mu\text{m}$ .
7. High level of green autofluorescence on slide including areas without FFPE tissue	7. Use of expired or unrecommended glass slides	7. Ensure that the coated glass slide (Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides) have not passed expiry date.

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

## Appendix 1 - Breast

### HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731

#### Protocol Checklist

Staining Run Log ID: \_\_\_\_\_

Date of the run: \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Lot: \_\_\_\_\_

Specimen ID: \_\_\_\_\_

Equipment ID: \_\_\_\_\_

Date of dilution/expiration of the 1 x Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Tissue fixed in neutral buffered formalin	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
---	------------------------------	-----------------------------

<b>Step 1: Pre-Treatment</b>		
Date of dilution/expiration of the Pre-Treatment Solution (Vial 1 diluted 1:20)		/
Measured temperature of Pre-Treatment Solution (95-99 °C) if water bath is used for heating		°C
Pre-treatment (10 minutes), and cooling (15 minutes)		
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		
<b>Step 2: Pepsin</b>		
Duration of Pepsin (Vial 2A) treatment at 37 °C or		Minutes
Duration of Pepsin (Vial 2A) treatment at room temperature (20-25 °C) or		Minutes
Duration of Pepsin immersion at 37 (±2) °C		Minutes
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		
Dehydrate slides (3 x 2 minutes) in graded series of ethanol and air dry		
<b>Step 3: HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix</b>		
Apply Probe Mix (Vial 3), coverslip and seal with Coverslip Sealant		
Measured denaturation temperature (66 (±1) °C)		°C
Denaturation for 10 minutes		
Measured hybridization temperature (45 (±2) °C)		°C
Hybridization time (60-120 minutes)		Minutes
<b>Step 4: Stringent Wash</b>		
Date of dilution/expiration of the Stringent Wash Buffer (Vial 4 diluted 1:20)		/
Measured temperature of Stringent Wash Buffer (63 (±2) °C)		°C
Stringent wash (10 minutes) after removing the coverslips		
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		°C
Dehydrate slides (3 x 2 minutes) in graded series of ethanol and air dry		Minutes

**Step 5: Mounting**

Apply 15 µL of Fluorescence Mounting Medium (Vial 5) and coverslip

Comments: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Date and signature, Technician: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Appendix 2 - Breast

### HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731

#### Scoring Scheme

Staining Run Log ID: \_\_\_\_\_

Date of the run: \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Lot: \_\_\_\_\_

Specimen ID: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

Ratio < 2: HER2 gene amplification was not observed

Ratio ≥ 2: HER2 gene amplification was observed

Date and signature, Technician: \_\_\_\_\_

Date and signature, Pathologist: \_\_\_\_\_

For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.

## **Appendix 3 - Breast**

### **HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731**

#### **Fluorescence Microscope Specifications**

**Dako recommends the following equipment for use with HER2 IQFISH pharmDx, K5731:**

- 1. Microscope type**
  - Epifluorescence microscope.
- 2. Lamp**
  - 100 watt mercury lamp (keep record of burning time).
- 3. Objectives**
  - For screening of the tissue, fluorescence dry 10X or fluorescence oil immersion 16X objectives are applicable.
  - For high power magnification and scoring of signals, only fluorescence oil immersion objectives, e.g. 100X are recommended.
- 4. Filters**

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

  - DAPI filter.
  - Texas Red/FITC double filter.
  - Texas Red and FITC single filters can be used for confirmation.

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

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

- 5. Oil**
  - Non-fluorescing oil.

#### **Precautions**

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

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

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

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

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

## **Summary and Explanation - Gastric**

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

Overexpression of the HER2 protein and amplification of the *HER2* gene in gastric cancer have been shown in a large number of studies (reviewed in (20)). HER2 positivity can be detected in approximately 20 % of the patients by either IHC or FISH (20). Preclinical in vitro and in vivo studies have demonstrated that trastuzumab (Herceptin™) is effective in different gastric cancer models thus leading to the initiation of several clinical studies (20-24). In a phase III study BO18255, the ToGA trial, HER2-positive patients with inoperable locally advanced, recurrent and/or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastro-esophageal junction were randomized to receive 5-FU or capecitabine and cisplatin either alone or in combination with trastuzumab. A statistically significant gain in overall survival (OS) was seen in the patients that received the combined treatment of trastuzumab and chemotherapy (25). Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody that binds with high affinity to the HER2 protein and has been shown to inhibit the proliferation of human tumor cells that overexpress HER2 protein in vitro and in vivo (21-24).

## **Principle of Procedure - Gastric**

*HER2* IQFISH pharmDx contains all key reagents required to complete a FISH procedure for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section specimens.

After deparaffinization and rehydration, specimens are heated in Pre-Treatment Solution followed by proteolytic digestion using Pepsin. After the heating and proteolytic pre-treatment steps, this kit employs a non-toxic, ready-to-use IQISH Probe Mix based on a combination of PNA (peptide nucleic acid) (12) and DNA technology. This Probe Mix consists of a mixture of Texas Red-labelled DNA probes covering a 218 kb region including the *HER2* gene on chromosome 17, and a mixture of fluorescein-labelled PNA probes targeted at the centromeric region of chromosome 17 (CEN-17). The specific hybridization to the two targets results in formation of a distinct red fluorescent signal at each *HER2* gene locus and a distinct green fluorescent signal at each chromosome 17 centromere. After a stringent wash, the specimens are mounted with Fluorescence Mounting Medium containing DAPI and coverslipped. Using a fluorescence microscope equipped with appropriate filters (see Appendix 3), tumor cells are located, and enumeration of the red (*HER2*) and green (CEN-17) signals is conducted. Then the *HER2*/CEN-17 ratio is calculated. Normal cells in the analyzed tissue section will serve as an internal positive control of pre-treatment and hybridization efficiency. For details see the Interpretation of Staining section.

For interactive e-learning please use the *HER2* IQFISH pharmDx e-learning program designed to supply laboratory technicians, pathologists and scientists with an accurate and fast knowledge of how to achieve optimal results using *HER2* IQFISH pharmDx:

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Reagents - Gastric

### Materials provided

The materials listed below are sufficient for 20 tests (a test is defined as one 22 mm x 22 mm target area). The number of tests is based on the use of 250 µL per slide of Vial 2A (5-8 drops), 10 µL per slide of Vial 3, and 15 µL per slide of Vial 5. The solutions in Vial 3 and Vial 5 are viscous and may have to be centrifuged shortly in a microcentrifuge in order to collect all of the provided reagent.

The kit provides materials sufficient for 10 individual staining runs (four separate runs, when using the pepsin immersing method). *HER2* IQFISH pharmDx is shipped on dry ice. **To ensure that kit components have not been exposed to high temperatures during transport, dry ice should still be present upon receipt.** Note that some kit components may remain unfrozen, this will not affect the performance of *HER2* IQFISH pharmDx.

#### Vial 1

**PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)**

**Pre-Treatment Solution (20x)**

150 mL, concentrated 20x

MES (2-[*N*-morpholino]ethanesulphonic acid) buffer.

#### Vial 2A

**PEPSIN**

**Pepsin**

4 x 6.0 mL, ready-to-use

Pepsin solution, pH 2.0; contains stabilizer and an antimicrobial agent.

#### Vial 2B

**PEPSIN DILUENT (10x)**

**Pepsin Diluent (10x)**

24 mL, concentrated 10x

Dilution buffer, pH 2.0; contains an antimicrobial agent.

#### Vial 3

**HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX**

**HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix**

0.2 mL, ready-to-use

Mix of Texas Red-labelled *HER2* DNA probes and fluorescein-labelled CEN-17 PNA probes; supplied in IQISH hybridization buffer

#### Vial 4

**STRINGENT WASH BUFFER (20x)**

**Stringent Wash Buffer (20x)**

150 mL, concentrated 20x

SSC (saline-sodium citrate) buffer with detergent (Tween-20).

#### Vial 5

**FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM**

**Fluorescence Mounting Medium**

0.4 mL, ready-to-use

Fluorescence mounting medium with 500 µg/L DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

#### Vial 6

**WASH BUFFER (20x)**

**Wash Buffer (20x)**

500 mL, concentrated 20x

Tris/HCl buffer.

**COVERSHEET SEALANT****Coverslip Sealant**

1 tube, ready-to-use

Solution for removable sealing of coverslips.

**NOTE:** The following kit reagents: Pre-Treatment Solution (20x), Pepsin, Pepsin Diluent (10x), Stringent Wash Buffer (20x), Fluorescence Mounting Medium, Wash Buffer (20x) and Coverslip Sealant, are interchangeable with the corresponding reagents in Dako Histology FISH Accessory Kit, Code K5799.

**Materials required but not provided**

Laboratory reagents  
Distilled or deionized water  
Ethanol, 96%  
Xylene or xylene substitutes

**Laboratory equipment**

Absorbent wipes  
Adjustable pipettes  
Calibrated partial immersion thermometer (range 37-100 °C)  
Calibrated surface thermometer (range 37-100 °C)  
Coverslips (22 mm x 22 mm)  
Forceps  
Fume hood  
Heating block or hybridization oven\*  
Humid hybridization chamber\*  
Microcentrifuge  
Slides, Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides (see Specimen Preparation)  
Staining jars or baths  
Timer (capable of 2–15 minute intervals)  
Vortex mixer  
Water bath with lid (capable of maintaining 37(±2) °C, 63 (±2) °C and from 95 °C to 99 °C)  
Microwave oven with sensing capability if pre-treatment is performed using microwave oven (see B3. Staining protocol. Step 1: Pre-treatment, Method B)

\* Instrumentation that allows for conditions identical to the ones described may be used for denaturation and hybridization.

**Microscope equipment and accessories**

Filters for fluorescence microscope: DAPI and FITC/Texas Red double filter, or FITC and Texas Red mono filters - see Appendix 3 for details

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

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

**Precautions - Gastric**

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. Stringent Wash Buffer (20x) is labeled: Safety data sheet available on request.
4. Pepsin is labeled:

**Danger**

Contains: reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H314	Causes severe skin burns and eye damage.
H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.
P304 + P340 + P310	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P301 + P310 + P331	IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or physician. Do NOT induce vomiting.
P303 + P361 + P353 + P310	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P305 + P310	IF IN EYES: Immediately call a POISON CENTER or physician.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

5. Pepsin Diluent (10x) is labeled:

**Danger**

Contains: reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H225	Highly flammable liquid and vapour.
H314	Causes severe skin and eye damage.
H317	May cause an allergic skin reaction.
H336	May cause drowsiness or dizziness.
H412	Harmful to aquatic life with long lasting effects.
P280	Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.
P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P273	Avoid release to the environment.
P304 + P340 + P310	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P301 + P310 + P331	IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or physician. Do NOT induce vomiting.
P303 + P361 + P353 + P310	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water. Immediately call a POISON CENTER or physician.
P305 + P310	IF IN EYES: Immediately call a POISON CENTER or physician.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

6. HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix is labeled:

**Warning**

Contains: Dextran sulfate sodium, ethylene carbonate

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
H373	May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection.
P260	Do not breathe vapor.
P304 + P340 + P312	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER or physician if you feel unwell.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

7. Wash Buffer (20x) is labeled:

**Warning**

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection.
P264	Wash hands thoroughly after handling.
P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

8. Coverslip Sealant is labeled:

**Danger**

Contains: Naphtha (petroleum), hydrotreated light

H225	Highly flammable liquid and vapour.
H315	Causes skin irritation.
H336	May cause drowsiness or dizziness.
H411	Toxic to aquatic life with long lasting effects.
P280	Wear protective gloves. Wear protective clothing. Wear eye or face protection.
P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P241	Use explosion-proof electrical, ventilating, lighting and all material-handling equipment.
P240	Ground and bond container and receiving equipment.
P273	Avoid release to the environment.
P304 + P340	IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable breathing.
P303 + P361 + P353	IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.
P235	Keep cool.

---

P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.
9.	Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and should be disposed of with proper precautions (13). Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
10.	Minimize microbial contamination of reagents to avoid erroneous results.
11.	Incubation times and temperatures, or methods other than those specified, may give erroneous results.
12.	Tissue fixation methods and thickness of specimen other than those specified may affect tissue morphology and/or signal intensity.
13.	Avoid evaporation of <i>HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix</i> during hybridization by ensuring sufficient humidity in the hybridization chamber.
14.	Reagents have been optimally diluted. Further dilution may result in loss of performance.
15.	Wear appropriate personal protective equipment to avoid contact with eyes and skin.
16.	Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
17.	Safety Data Sheets are available on <a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a> or on request.
18.	As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet (SDS) for additional information.
19.	Due to the heterogeneous nature of gastric cancer specimens it is important to perform a thorough scanning of the entire specimen to evaluate signal distribution before selecting the area for signal enumeration.
20.	It is not recommended to evaluate very small specimens (i.e. specimens must have intact morphology and sufficient nuclei for enumeration).
21.	If <i>HER2 FISH</i> analysis is performed on a biopsy specimen, multiple (7-8) evaluable biopsies from different regions of the tumor should be analyzed to ensure reliable determination of <i>HER2</i> status.
22.	For identification of all tissue cores in a biopsy sample it is important to inspect the H&E stained slide.
23.	Only clean staining jars should be used for the pepsin immersion method (Step 2, method C).

## **Storage - Gastric**

Store the *HER2/CEN-17* IQISH Probe Mix (Vial 3) at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  in the dark. All other reagents can be stored at  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$  in the dark. All reagents tolerate frozen storage. Freezing and thawing the reagents for up to 10 times does not affect performance.

The Pepsin, *HER2/CEN-17* IQISH Probe Mix, and Fluorescence Mounting Medium (Vials 2A, 3 and 5) may be affected adversely if exposed to heat. Do not leave these components at room temperature.

The *HER2/CEN-17* IQISH Probe Mix and Fluorescence Mounting Medium (Vials 3 and 5) may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store these components or perform analysis in strong light, such as direct sunlight.

Do not use the kit after the expiration date stamped on the kit box. If reagents are stored under conditions other than those specified in this package insert, the user must validate reagent performance (14).

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

## **Specimen Preparation - Gastric**

Adenocarcinoma specimens of the stomach including gastro-esophageal junction from biopsies, excisions or resections must be handled to preserve the tissue for FISH analysis. Standard methods of tissue processing for immunocytochemical staining should be used for all specimens (15). When testing small biopsy specimens, ascertain of intact tumor morphology and the presence of sufficient nuclei for signal enumeration. If *HER2* FISH analysis is performed on a biopsy specimen, multiple (7-8) evaluable biopsies from different regions of the tumor should be analyzed to ensure reliable determination of *HER2* status.

### **Paraffin-embedded sections**

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

Tissue specimens should be cut into sections of 3-6  $\mu\text{m}$ .

The slides required for *HER2* gene amplification analysis and verification of tumor presence should be prepared at the same time. A minimum of 2 serial sections is recommended, 1 section for tumor presence stained with hematoxylin and eosin (H&E stain), and 1 section for *HER2* gene amplification analysis. It is recommended that tissue sections are mounted on Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides. Specimens should be analyzed within 4-6 months of sectioning when stored at room temperature ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ).

**INSTRUCTIONS FOR USE - Gastric****A. Reagent Preparation - Gastric**

It is convenient to prepare the following reagents prior to staining:

**A.1 Pre-Treatment Solution**

Crystals may occur in Vial 1, but they will dissolve at room temperature. Ensure that no crystals are present before preparation of reagent.

Dilute a sufficient quantity of Vial 1 (Pre-Treatment Solution 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted solution if cloudy in appearance.

**A.2 Stringent Wash Buffer**

Dilute a sufficient quantity of Vial 4 (Stringent Wash Buffer 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted buffer may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted buffer if cloudy in appearance.

**A.3 Wash Buffer**

Dilute a sufficient quantity of Vial 6 (Wash Buffer 20x) by diluting the concentrate 1:20 in distilled or deionized water. Unused diluted buffer may be stored at 2-8 °C for one month. Discard diluted buffer if cloudy in appearance.

**A.4 Ethanol series**

From a 96% ethanol solution, prepare 3 jars with 70%, 85%, and 96% ethanol, respectively. Store covered jars at room temperature or at 2-8 °C, and use for a maximum of 200 slides. Discard solutions if cloudy in appearance.

**A.5 Pepsin solution**

A pepsin solution is only needed when using the pepsin immersing method (Method C).

Prepare pepsin solution as follows:

For a six slide capacity container prepare 60 mL pepsin solution:

Add 48 mL of room temperature (20-25 °C) distilled or deionized water to the container.

Add 6 mL of cold (2-8 °C) Pepsin Diluent (10x) (Vial 2B) to the container.

Add 6 mL of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to the container.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath.

For 24 slides capacity container and 240 mL pepsin solution:

Add 192 mL of room temperature (20-25 °C) distilled or deionized water to the container.

Add 24 mL of cold (2-8 °C) Pepsin Diluent (10x) (Vial 2B) to the container.

Add 24 mL of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to the container.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath.

Equilibrated pepsin solution should be used within 5 hours.

## B. Staining Procedure - Gastric

### B.1 Procedural notes

The user should read these instructions carefully and become familiar with all components prior to use (see Precautions).

All reagents should be equilibrated to the relevant temperature prior to use as follows:

**Vial 1:** The diluted Pre-Treatment Solution should be equilibrated to **95-99 °C** if water bath is used for pre-treatment (B3. Staining protocol, Step 1: Pre-Treatment Method A). If microwave oven with sensing capability is used for pre-treatment (B3. Staining protocol, Step 1: Pre-Treatment, Method B) the diluted Pre-Treatment Solution should be equilibrated to room temperature 20-25 °C.

**Vial 2A:** Pepsin should be applied at **2-8 °C** (B3, Staining protocol, Step 2 Method A and B) and kept cold continuously.

**Vial 2B:** Pepsin Diluent (10x) should be applied at **2-8 °C** (B3, Staining protocol, Step 2 Method C).

**Vial 3:** HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix separates into two phases while stored at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Prior to use of Vial 3 ensure that only one phase is present by equilibrating the probe mix to room temperature (**20-25 °C**) followed by mixing; Thaw Vial 3 at room temperature (20-25 °C) for a maximum of 30 minutes (protect from strong light), then thoroughly whirl the vial for 15 seconds at 2500 rpm using a vortex mixer. Store Vial 3 at  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  immediately after use.

**Vial 4:** Diluted Stringent Wash Buffer; one jar should be equilibrated to room temperature, another jar should be equilibrated to **63 ( $\pm 2$ ) °C** prior to use.

**Vial 5:** Fluorescence Mounting Medium may be applied at any temperature from **2-25 °C**.

**Vial 6:** The Diluted Wash Buffer should be equilibrated to room temperate **20-25 °C**.

**Coverslip Sealant** may be applied at any temperature from **2-25 °C**.

**All steps must be performed at the outlined temperature.**

The procedure includes a number of dehydrations followed by drying of the tissue sections. Ensure that tissue sections are completely dry before proceeding to the next step. Do not allow tissue sections to dry during the other procedural steps.

If the staining procedure has to be interrupted, slides may be kept in Wash Buffer after the deparaffinization step for up to 1 hour at room temperature (20-25 °C) without affecting the results.

### B.2 Treatment of tissues prior to staining

**Deparaffinization and rehydration:** Prior to performing the analysis, tissue slides must be deparaffinized to remove embedding medium and rehydrated. Avoid incomplete removal of paraffin. Residual embedding medium will result in increased non-specific staining. This step should be performed at room temperature (20-25 °C).

1. Place slides in a xylene bath and incubate for 5 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
2. Tap off excess liquid and place slides in 96% ethanol for 2 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
3. Tap off excess liquid and place slides in 70% ethanol for 2 ( $\pm 1$ ) minutes. Change baths and repeat once.
4. Tap off excess liquid and place slides in diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for a minimum of 2 minutes. Commence staining procedure as outlined in Section B.3, Step 1, Pre-Treatment.

Xylene and alcohol solutions should be changed after 200 slides or less.

Xylene substitutes may be used.

**NOTE:** The reagents and instructions supplied in this kit have been designed for optimal performance. Further dilution of the reagents or alteration of incubation temperatures may give erroneous or discordant results. Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may invalidate the assay results.

## B.3 Staining protocol

### Step 1: Pre-Treatment

Pre-treatment can be performed either by using water bath as described in method A) or, alternatively, by use of microwave oven with sensing capability as described in method B).

#### Method A: Pre-treatment using water bath

Fill staining jars, e.g. Coplin jars, with the diluted Pre-Treatment Solution (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.1). Place staining jars containing diluted Pre-Treatment Solution in water bath. Heat water bath and the Pre-Treatment Solution to 95-99 °C. Measure temperature inside jar with a calibrated thermometer to ensure correct temperature. Cover jars with lids in order to stabilize the temperature and avoid evaporation.

Immerse the room temperature deparaffinized sections into the preheated Pre-Treatment Solution in the staining jars. Re-check temperature and incubate for 10 ( $\pm 1$ ) minutes at 95-99 °C.

Remove the entire jar with slides from the water bath. Remove lid and allow the slides to cool in the Pre-Treatment Solution for 15 minutes at room temperature.

Transfer the slides to a jar with diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

**NOTE:** The Pre-Treatment Solution is designed for single use application only. Do not re-use.

#### Method B: Pre-treatment using microwave oven with sensing capability

Fill a plastic jar with diluted room temperature (20-25 °C) Pre-Treatment Solution. Immerse the deparaffinized sections in Pre-Treatment Solution, cover the jar with a punctured lid and place it in the microwave oven. Select the boiling sensor function and a program that runs for 10 minutes after boiling temperature has been reached\*.

Following the 10 minutes incubation take the jar with slides out of the oven, remove the lid and cool for 15 minutes at room temperature. Transfer the slides to a jar with diluted Wash Buffer and soak for 3 minutes at room temperature (20-25 °C). Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

\* The use of a microwave oven with a sensing capability means that the oven must include a sensor and programs which initially heat the Pre-Treatment Solution to the boiling point and subsequently maintain the required pre-treatment temperature (above 95 °C) while counting down the preset time (10 ( $\pm 1$ ) minutes). Some microwave oven models with sensing capability may not include the possibility to freely set a count-down time. If the model only includes pre-set programs, be sure to select a program which maintain the required pre-treatment temperature (above 95 °C) for at least 10 ( $\pm 1$ ) minutes and manually stop the program after 10 ( $\pm 1$ ) minutes.

**NOTE:** The Pre-Treatment Solution is designed for a single use application only. Do not re-use.

### Step 2: Pepsin, ready-to-use (RTU) or pepsin solution

Pepsin incubation can be performed by direct application of RTU pepsin drops to the slides either at room temperature (20-25 °C) (Method A) or at 37 °C (Method B). Alternatively, slides can be immersed into a pepsin solution and incubated at 37 ( $\pm 2$ ) °C (Method C)

#### Method A and Method B:

Tap off excess buffer. Using lintless tissue (such as an absorbent wipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagents within the prescribed area.

Apply 5-8 drops (250 µL) of cold (2-8 °C) Pepsin (Vial 2A) to cover specimen. Always store Pepsin at 2-8 °C.

## Method A: Pepsin, RTU - Incubation at 20-25 °C

Incubate for 5-15 minutes at room temperature (20-25 °C). An incubation time of 5-15 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess Pepsin and soak sections in the diluted Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.3) for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace diluted Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

## Method B: Pepsin, RTU - Incubation at 37 °C

Place specimen with Pepsin on a heating block at 37 °C and incubate for 3-5 minutes. An incubation time of 3-5 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess Pepsin and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to air dry completely.

## Method C: Pepsin solution - Immersion of slides into 37 °C pepsin solution

The kit contains reagents sufficient for four separate runs (60 mL pepsin solution, small container for six slides) or a single run (240 mL pepsin solution, large container for 24 slides). Prepare the pepsin solution as described in section A.5.

Put lid on the container and equilibrate the pepsin solution to 37 ( $\pm 2$ ) °C in a water bath. Ensure that the temperature has stabilized. Measure temperature inside the container with a calibrated thermometer to ensure correct temperature.

Tap off excess wash buffer. Immerse slides into the 37 ( $\pm 2$ ) °C pepsin solution and incubate for 20-30 minutes. An incubation time of 20-30 minutes will be adequate for most specimens, but the optimal incubation time may depend on tissue fixation and/or thickness of specimen and should be determined by the user.

Tap off excess pepsin solution and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Replace Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes. Continue to dehydration.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to air dry completely.

## **Step 3: HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix**

HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix separates into two phases while stored at  $\leq -18$  °C. Prior to use of Vial 3 ensure that only one phase is present by equilibrating the probe mix to room temperature (**20-25 °C**) followed by mixing. Thaw Vial 3 at room temperature (20-25 °C) for a maximum of 30 minutes (protect from strong light), then thoroughly whirl the vial for 15 seconds at 2500 rpm using a vortex mixer. Immediately store Vial 3 at  $\leq -18$  °C after use.

Apply 10 µL of HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix (Vial 3) to the centre of the tissue section.

Immediately place a 22 mm x 22 mm glass coverslip over the Probe Mix and allow it to spread evenly under the coverslip. Avoid air bubbles. If air bubbles are observed, gently tap them away from the tissue using forceps.

**Remember to store Vial 3 at  $\leq -18$  °C immediately after use.**

Seal coverslip with Coverslip Sealant by ejecting the Sealant around the periphery of the coverslip. Allow the Coverslip Sealant to overlap the coverslip and the slide, thereby forming a seal around the coverslip. Make sure that the Coverslip Sealant covers the entire edge of the coverslip.

Place slides on a flat metal or stone surface (heating block or on a block in a hybridization oven) preheated to 66 ( $\pm 1$ ) °C. Denature for exactly 10 minutes.

Place slides in a preheated humidified hybridization chamber. Cover the chamber with a lid and incubate at 45 ( $\pm 2$ ) °C for 60-120 minutes\*. Please note that a hybridization temperature of 37 °C is not suitable for use with the probes contained within this kit.

\* Instrumentation that allows for conditions identical to the ones described above may be used for denaturation and hybridization.

## Step 4: Stringent Wash

Fill two staining jars, e.g. Coplin jars, with the diluted Stringent Wash Buffer (see INSTRUCTIONS FOR USE, Section A.2). A minimum volume of 100 mL or 15 mL per slide in each jar is recommended.

Place one of the staining jars containing diluted Stringent Wash Buffer at room temperature in a fume hood and the other in a water bath. Heat water bath and the diluted Stringent Wash Buffer to 63 ( $\pm 2$ ) °C. Ensure that the temperature has stabilized. Cover jar with lid in order to stabilize the temperature and avoid evaporation. Measure temperature inside the water bath jar with a calibrated thermometer to ensure correct temperature. The Stringent Wash Buffer contains detergent and may become turbid at 63 °C; this will not affect performance.

Using forceps or gloves, take slides from the hybridization chamber and gently remove Coverslip Sealant as well as coverslip and place slides in the room temperature pre-wash jar, one at a time.

As soon as all coverslips have been removed, transfer slides from the room temperature, pre-wash jar to the 63 ( $\pm 2$ ) °C jar in the water bath.

Immediately after transferring the slides into the 63 ( $\pm 2$ ) °C jar in the water bath the timer should be started. Perform stringent wash for exactly 10 minutes.

Remove slides from the diluted Stringent Wash Buffer, and soak sections in diluted Wash Buffer for 3 minutes at room temperature (20-25 °C).

Change diluted Wash Buffer and soak sections for another 3 minutes.

Dehydrate tissue sections through a graded series of ethanol: 2 minutes in 70% ethanol, 2 minutes in 85% ethanol, and 2 minutes in 96% ethanol.

Allow tissue sections to dry completely.

## Step 5: Mounting

Apply 15 µL of Fluorescence Mounting Medium containing DAPI (Vial 5) to the target area of the slide and apply a glass coverslip.

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

## **Quality Control - Gastric**

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

## **Interpretation of Staining - Gastric**

### **Assessable tissue**

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

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

#### *1) Homogenous signal distribution*

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

#### *2) Heterogeneous signal distribution*

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

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

If possible, do not select overlapping areas.

### **Disregard staining of bacterial DNA**

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

### Signal enumeration

When an area has been selected for signal evaluation, begin analysis in one of the 20 adjacent chosen nuclei and then count in a cell-by-cell fashion only leaving out nuclei that do not meet the quality criteria. Count the number of signals within the nuclear boundary of each evaluated nucleus according to the guidelines below (see also Appendix 7).

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

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

### Signal counting guide

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

Record counts in a table as shown in Appendix 5 and 6.

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

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

Specimens with a *HER2/CEN-17* ratio above or equal to 2 should be considered *HER2* gene amplified (26).

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

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

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

### **Limitations - Gastric**

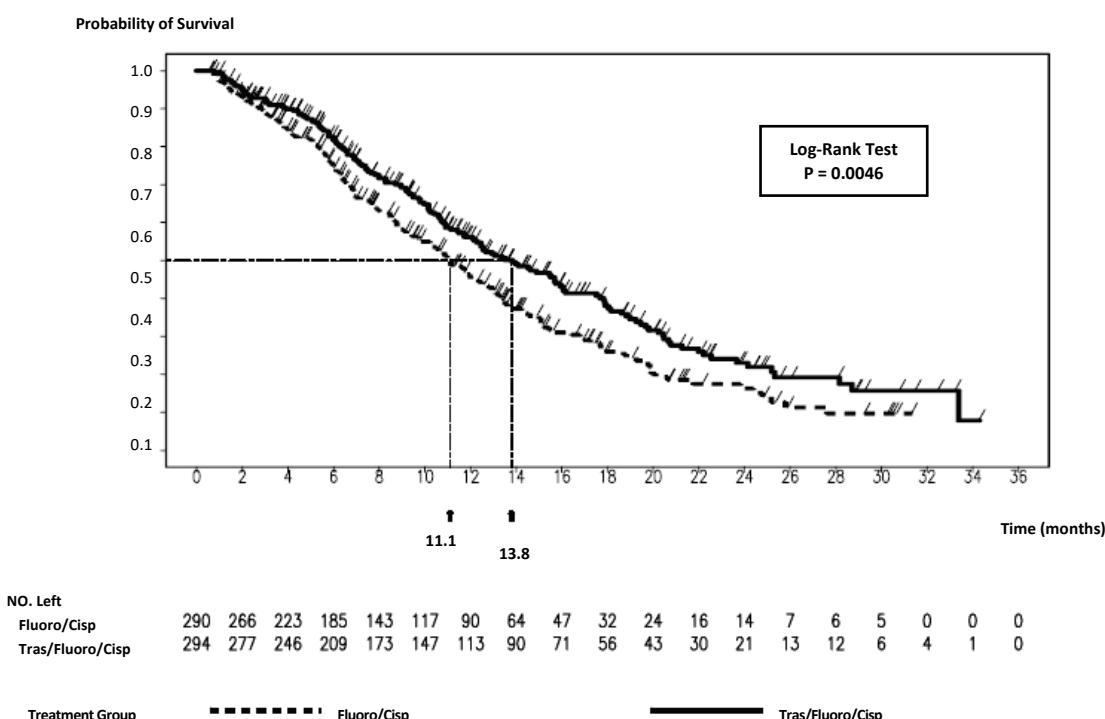
1. FISH is a multi-step process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, as well as in tissue selection, fixation, and processing, preparation of the FISH slide, and interpretation of the staining results.
2. FISH results are dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may influence on probe hybridization. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.
3. For optimal and reproducible results, the tissue slides must be deparaffinized completely. The paraffin removal needs to be completed at the beginning of the staining process. (See INSTRUCTIONS FOR USE, section B.2).
4. Only temperature-calibrated water bath, heating block, and hybridization oven should used. Use of other types of equipment may result in evaporation of *HER2/CEN-17* IQISH Probe Mix during hybridization and must be validated by user.

## Performance Characteristics - Gastric

### Background

The safety and efficacy of trastuzumab (Herceptin™) has been demonstrated in a clinical study (the ToGA trial) (25). The study was designed as an open labeled, randomized, multicenter phase III study in HER2-positive patients with inoperable locally advanced, recurrent and/or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastro-esophageal junction. In ToGA trial the HER2 positivity was defined as being either IHC-positive (3+) (HercepTest™, Dako) and/or positive by *HER2* FISH (*HER2*/CEN-17 $\geq$ 2.0) (*HER2* FISH pharmDx Kit, Dako (Code K5331)). After inclusion in the study the patients were randomized to receive chemotherapy (5-FU or capecitabine and cisplatin) or chemotherapy plus trastuzumab. The primary endpoint in the study was overall survival (OS).

In the study a total 594 patients were randomized and 584 patients received the study medication and were included in the full analyses set (FAS). For the primary endpoint the combination of chemotherapy plus trastuzumab was shown to be statistically superior to chemotherapy alone. The median OS increased from 11.1 to 13.8 months ( $p=0.0046$ ) with a hazard ratio of 0.74 (95 % CI: 0.60–0.91). The Kaplan-Meier curves for OS are shown in Figure 3.

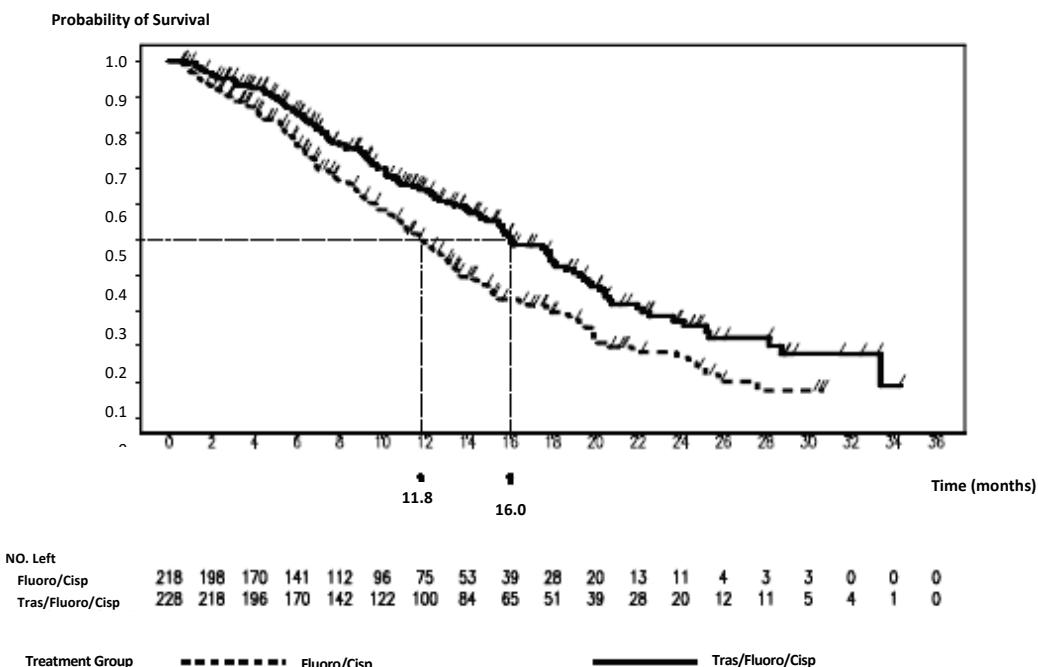


**Figure 3.** Kaplan-Meier curve of OS (n=584).

Pre-specified exploratory subgroup analyses by HER2 status were performed once the data were available, and in addition two new HER2 subgroups were defined post hoc based on IHC scoring:

- Group 1 (“low HER2 expressing group”):** IHC 0/FISH+ and IHC 1+/FISH+ (n=131)
- Group 2 (“high HER2 expressing group”):** IHC 2+/FISH+ and IHC 3+ (FISH+ or FISH - or FISH no result) (n=446)

When the primary analysis on OS was repeated post hoc for the “high HER2 expressing group” (n=446) the benefit in favor of the combined treatment was even greater. The median OS for the group of patients who had received chemotherapy plus trastuzumab increased to 16.0 months compared to 11.8 months for the patients on chemotherapy alone. The hazard ratio for this analysis decreased to 0.65 (95 % CI: 0.51–0.83). The Kaplan-Meier curves for OS for the “high HER2 expressing group” is shown in Figure 4.



**Figure 4.** Kaplan-Meier curve of OS for the “high HER2 expressing group” (n=446).

The BO18255 study demonstrated the clinical utility of both HercepTest™ and *HER2* FISH pharmDx Kit for the assessment of *HER2* status in patients with inoperable locally advanced, recurrent and/or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastro-esophageal junction.

#### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the *HER2*/CEN-17 IQISH Probe Mix was investigated using 18 gastric cancer adenocarcinoma specimens. The ratio between the number of *HER2* signals and CEN-17 signals was calculated based on a counting of 20 nuclei from normal cells surrounding the tumor. The *HER2*/CEN-17 ratio for the 18 gastric cancer adenocarcinoma specimens was between 0.95 and 1.06.

#### Analytical specificity

The *HER2* DNA probes in the *HER2*/CEN-17 IQISH Probe Mix have been end-sequenced and mapped to confirm a total coverage of 218 kb including the *HER2* gene. The CEN-17 PNA probes in the *HER2*/CEN-17 IQISH Probe Mix have been tested individually and in combination to confirm their specific hybridization to the centromeric region of chromosome 17.

To measure the assay's ability to solely identify the target substances *HER2* and CEN-17 without interference from other substances studies were performed on gastric cancer adenocarcinoma specimens using Vial 3 containing the hybridization buffer but without the probe mix. A total of 18 specimens were evaluated for presence of signals not related to the probe mix. No detection of other chromosome targets or interference with closely related substances was observed in any of the 18 specimens.

#### Robustness studies

The robustness of the *HER2* IQFISH pharmDx assay was tested by varying pre-treatment time, temperature, and methods for heating of pre-treatment buffer (microwave oven or water bath), pepsin incubation time and method (RTU pepsin or immersion), denaturation temperature and time, hybridization time, and stringent wash time and temperature.

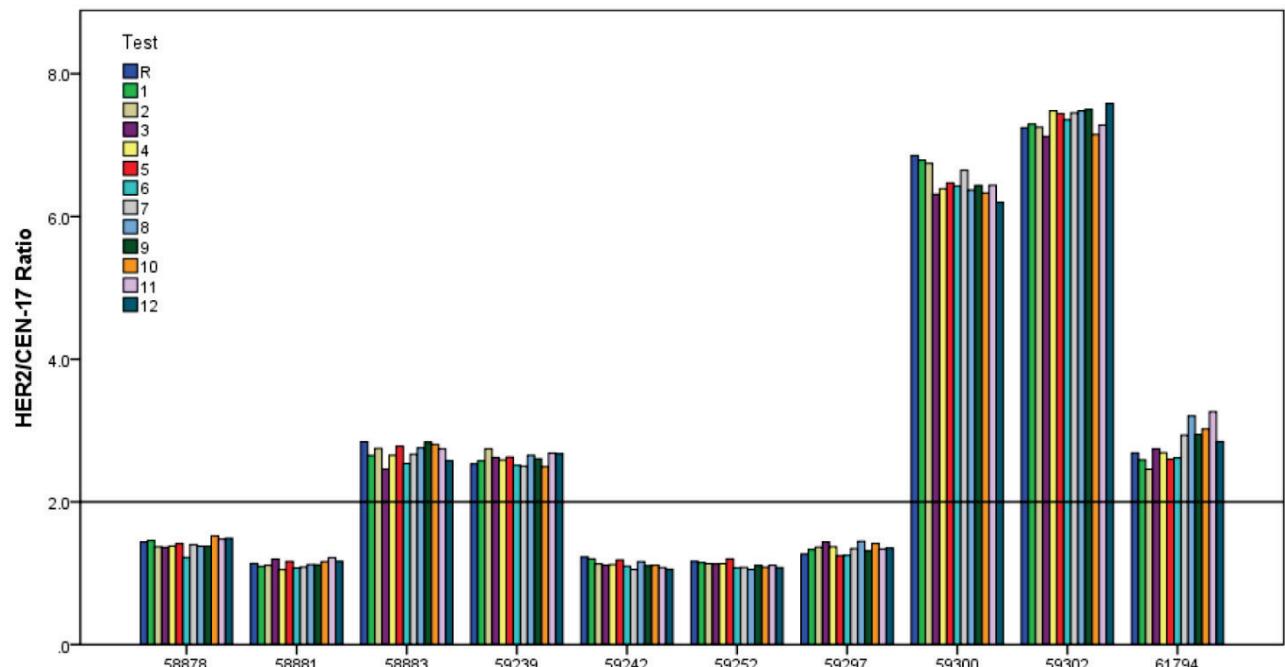
No significant difference in results was observed at the following experimental conditions:

- Pre-treatment Method A) Water bath for 10 minutes combined with each of the temperatures 95 °C, 95-99 °C, and 99 °C together with 9, 10 and 11 minutes at 95-99 °C.
- Pretreatment Method B) Microwave oven for 9, 10, and 11 minutes at > 95 °C.

- Pepsin digestion Method A) with incubation times of 5, 10, and 15 minutes at room temperature (20-25 °C).
- Pepsin digestion Method B) with incubation times of 3, 4, and 5 minutes at 37 °C.
- Pepsin digestion Method C) with incubation times of 20, 25, and 30 minutes combined with each of the temperatures 35, 37, and 39 °C.
- Denaturation for 10 mintues combined with each of the temperatures 65, 66, and 67 °C together with 9, 10, and 11 minutes at 66 °C.
- Hybridization times of 60, 90, and 120 minutes at 45 °C.
- Stringent wash for 10 minutes combined with each of the temperatures 61, 63, and 65 °C together with 9, 10, and 11 minutes at 63 °C.

**Note:** For the robustness tests only one parameter in the staining procedure was changed at a time while all other parameters were kept constant. It is recommended to adhere to the time and temperatures indicated in the staining procedure.

The staining procedure for *HER2* IQFISH pharmDx offers protocol variables for heat pre-treatment, pepsin digestion and hybridization time. Each unique combinatorial option has been validated with regard to *HER2* gene status. Validation was performed on 10 FFPE specimens of human gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma for each of the 12 possible combinatorial options. *HER2* FISH pharmDx Kit (K5331) was used as reference. *HER2/CEN-17* ratio for each individual specimen is shown in Figure 5. Cross tabulations between the 12 tests and the reference staining showed overall agreement in *HER2* gene status of 100% (10/10) with lower and upper two-tailed 95% confidence limits at 78.3% and 100%, respectively. Kappa value was 1.00 and McNemars test showed absence of bias (two-tailed p-value of 1.00).



**Figure 5.** Individual *HER2/CEN-17* ratios for 10 human gastric adenocarcinoma specimens stained using the 12 combinatorial protocol variations possible with *HER2* IQFISH pharmDx (Code K5731) (Test 1-12) and the *HER2* FISH pharmDx Kit (Code K5331) reference (R). The horizontal line illustrates the cut-off value of 2.0.

**Repeatability**

The repeatability of the *HER2/CEN-17* ratio was investigated with the *HER2 IQFISH pharmDx* assay using consecutive sections from nine different gastric adenocarcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status. Triplicate sections of each specimen were tested in the same run. The average coefficient of variance was 3.5% for non-amplified specimens (range from 1% to 5%) and 2.8% for amplified specimens (range 1% to 5%).

Repeatability on consecutive sections of gastric adenocarcinoma specimens with different thickness (2, 3, 4, 5, 6, and 7 µm) was tested with *HER2 IQFISH pharmDx*. The average coefficient of variance of the *HER2/CEN-17* ratio was 4.5% (range from 3% to 6%). i.e. in the same range as for tissue of equal thickness and within the pre-set acceptance criteria.

**Reproducibility**

The *HER2 IQFISH pharmDx* assay was tested for lot-to-lot and observer-to-observer reproducibility using three lots of *HER2 IQFISH pharmDx* and three observers. Reproducibility was tested on nine different gastric adenocarcinoma specimens with either non-amplified or amplified *HER2* gene status.

The average coefficient of variation for lot-to-lot reproducibility was 3.8% for non-amplified specimens (range from 2% to 7%) and 1.8% for amplified specimens (range from 1% to 3%). The average coefficient of variation for observer-to-observer reproducibility was 4.3% for non-amplified specimens (range from 3% to 5%) and 4.4% for amplified specimens (range from 2% to 7%). Gastric adenocarcinoma specimens consisted of 78.8% resection and 22.2% biopsy specimens. 55.6% of the specimens were obtained from stomach and 44.4% was from gastroesophageal junction.

**Clinical utility**

The clinical utility of Dako *HER2 IQFISH pharmDx* (Code K5731) was investigated in a comparative study with Dako *HER2 FISH pharmDx Kit* (Code K5331). The study included 79 gastric cancer specimens consisting of different gastric adenocarcinoma tissue types, i.e. stomach or gastro-esophageal junction adenocarcinomas and resections or biopsies with homogeneous or heterogeneous (focal or mosaic) signal distribution. The tumors had all been evaluated for *HER2* protein expression status using Dako HercepTest™ (Code K5207). Specimens from each of the four IHC scoring groups (0, 1+, 2+, 3+) were included in the study. Cross tabulation of *HER2* status obtained by the two assays gave an overall agreement of 98.7% with lower and upper limits for the 95% confidence interval at 94.2% and 99.9%. The Kappa value was 0.97 with lower and upper limits for the 95% confidence interval at 0.92 and 1.00. The p-value for McNemars test was 1.00 indicating absence of bias between the two assays.

## Troubleshooting - Gastric

Problem	Probable Cause	Suggested Action
1. No signals or weak signals	1a. Kit has been exposed to high temperatures during transport or storage  1b. Microscope not functioning properly - Inappropriate filter set - Improper lamp - Mercury lamp too old - Dirty and/or cracked collector lenses - Unsuitable immersion oil  1c. Faded signals  1d. Pre-treatment conditions incorrect  1e. Evaporation of Probe Mix during hybridization	1a. Check storage conditions. Ensure that dry ice was present when the consignment was received. Ensure that vial 3 has been stored at ≤ -18 °C in the dark. Ensure that vials 2A and 5 have been stored at maximum 2–8 °C in the dark.  1b. Check the microscope and ensure that the used filters are suitable for use with the kit fluorochromes, and that the mercury lamp is correct and has not been used beyond expected lifetime. (see Appendix 7). In case of doubt, please contact your local microscope vendor.  1c. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light sources.  1d. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used  1e. Ensure sufficient humidity in the hybridization chamber
2. No green signals	2a. Stringent wash conditions incorrect	2a. Ensure that the recommended stringent wash temperature and time are used, and that coverslips are removed before performing stringent wash
3. No red signals	3a. Pre-treatment conditions incorrect	3a. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used
4. Areas without signal	4a. Probe volume too small  4b. Air bubbles caught during Probe Mix application or mounting	4a. Ensure that the probe volume is large enough to cover the area under the coverslip  4b. Avoid air bubbles. If observed, gently tap them away using forceps
5. Excessive background staining	5a. Inappropriate tissue fixation	5a. Ensure that only formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are used

## Gastric Cancer

Problem	Probable Cause	Suggested Action
	5b. Paraffin incompletely removed 5c. Stringent wash temperature too low 5d. Prolonged exposure of hybridized section to strong light	5b. Follow the deparaffinization and rehydration procedures outlined in Section B.2 5c. Ensure that the stringent wash temperature is 63 ( $\pm 2$ ) °C 5d. Avoid long microscopic examination and minimize exposure to strong light
6. Poor tissue morphology	6a. Incorrect Pepsin treatment  6b. Incorrect pre-treatment conditions may result in unclear or cloudy appearance  6c. Too long Pepsin treatment or very thin section thickness may cause ghost cells or donut cells to appear.	6a. Adhere to recommended Pepsin incubation times. See section B.3, step 2. Ensure that the Pepsin is handled at the correct temperature. See Section B.1  6b. Ensure that the recommended pre-treatment temperature and time are used  6c. Shorten the Pepsin incubation time. See section B.3, step 2. Ensure that the section thickness is 3-6 $\mu\text{m}$ .
7. High level of green auto fluorescence on slide including areas without FFPE tissue	7. Use of expired or unrecommended glass slides	7. Ensure that the coated glass slide (Dako Silanized Slides, Code S3003, or poly-L-lysine-coated slides) have not passed expiry date.

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

**Appendix 4 - Gastric*****HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731***

## Protocol Checklist

Staining Run Log ID: \_\_\_\_\_

Date of the run: \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Lot: \_\_\_\_\_

Specimen ID: \_\_\_\_\_

Equipment ID: \_\_\_\_\_

Date of dilution/expiration of the 1 x Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Tissue fixed in neutral buffered formalin	Yes <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
---	------------------------------	-----------------------------

<b>Step 1: Pre-Treatment</b>		
Date of dilution/expiration of the Pre-Treatment Solution (Vial 1 diluted 1:20)	/	
Measured temperature of Pre-Treatment Solution (95-99 °C) if water bath is used for heating		°C
Pre-treatment (10 minutes), and cooling (15 minutes)		
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		
<b>Step 2: Pepsin</b>		
Duration of Pepsin (Vial 2A) treatment at 37 °C or		Minutes
Duration of Pepsin (Vial 2A) treatment at room temperature (20-25 °C) or		Minutes
Duration of Pepsin immersion at 37 ( $\pm 2$ ) °C		Minutes
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		
Dehydrate slides (3 x 2 minutes) in graded series of ethanol and air dry		
<b>Step 3: HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix</b>		
Apply Probe Mix (Vial 3), coverslip and seal with Coverslip Sealant		
Measured denaturation temperature (66 ( $\pm 1$ ) °C)		°C
Denaturation for 10 minutes		
Measured hybridization temperature (45 ( $\pm 2$ ) °C)		°C
Hybridization time (60-120 minutes)		Minutes
<b>Step 4: Stringent Wash</b>		
Date of dilution/expiration of the Stringent Wash Buffer (Vial 4 diluted 1:20)	/	
Measured temperature of Stringent Wash Buffer (63 ( $\pm 2$ ) °C)		°C
Stringent wash (10 minutes) after removing the coverslips		
Wash in Wash Buffer (Vial 6 diluted 1:20) (2 x 3 minutes)		°C
Dehydrate slides (3 x 2 minutes) in graded series of ethanol and air dry		Minutes

**Step 5: Mounting**

Apply 15 µL of Fluorescence Mounting Medium (Vial 5) and coverslip

Comments: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Date and signature, Technician: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Appendix 5 - Gastric

### HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731

#### Scoring Scheme

**HER2 IQFISH pharmDx, K5731**      Lot: \_\_\_\_\_      Staining Run Log ID: \_\_\_\_\_

Date of the run: \_\_\_\_\_ Specimen ID: \_\_\_\_\_

#### Characterization of signal distribution in tissue:

Homogeneous:

Heterogeneous – Focal:       or      Heterogeneous – Mosaic:

Count signals in 20 nuclei					
Nuclei no.	Red (HER2)	Green (CEN-17)	Nuclei no.	Red (HER2)	Green (CEN-17)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1-10			Total 11-20		

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

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

HER2 FISH	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17 ratio
TOTAL SCORE (1-20)			

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

Date and signature, Technician: \_\_\_\_\_

Date and signature, Pathologist: \_\_\_\_\_

For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.

## Appendix 6 - Gastric

### HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731 Recount Scoring Scheme

**HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Lot:** \_\_\_\_\_ **Staining Run Log ID:** \_\_\_\_\_  
**Date of the run:** \_\_\_\_\_ **Specimen ID:** \_\_\_\_\_

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

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

HER2 FISH	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17 ratio
TOTAL SCORE (1-40)			

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

Date and signature, Technician: \_\_\_\_\_

Date and signature, Pathologist: \_\_\_\_\_

*For scoring guidelines: see Interpretation of Staining.*

## **Appendix 7 - Gastric**

### **HER2 IQFISH pharmDx, Code K5731 Fluorescence Microscope Specifications**

**Dako recommends the following equipment for use with HER2 IQFISH pharmDx, K5731:**

- 1. Microscope type**
  - Epifluorescence microscope.
- 2. Lamp**
  - 100 watt mercury lamp (keep record of burning time).
- 3. Objectives**
  - For screening of the tissue, fluorescence dry 10X or fluorescence oil immersion 16X objectives are applicable.
  - For high power magnification and scoring of signals, only fluorescence oil immersion objectives, e.g. 100X are recommended.
- 4. Filters**

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

  - DAPI filter.
  - Texas Red/FITC double filter.
  - Texas Red and FITC single filters can be used for confirmation.

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

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

- 5. Oil**
  - Non-fluorescing oil.

#### **Precautions**

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

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

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

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

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

## **FRANÇAIS**

### **Utilisation prévue**

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Le test *HER2* IQFISH pharmDx est un test d'hybridation *in situ* en fluorescente directe (FISH) conçu pour la détermination quantitative de l'amplification du gène *HER2* dans des échantillons tissulaires de cancers du sein fixés au formol et inclus en paraffine et des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine de patients atteints d'adénocarcinome de l'estomac, y compris de la jonction gastro-œsophagienne.

L'utilisation du test *HER2* IQFISH pharmDx est indiquée, en plus du test HercepTest™, pour l'évaluation des patients chez lesquels un traitement par Herceptin™ (trastuzumab) est envisagé (voir la notice de l'Herceptin™).

Dans le cas de patients atteints d'un cancer du sein, les résultats obtenus avec le test *HER2* IQFISH pharmDx sont à utiliser conjointement aux informations de pathologie clinique permettant actuellement d'évaluer le pronostic des patients atteints d'un cancer du sein de stade II, à ganglions positifs.

Dans ce document, les termes « cancer gastrique » ou « cancer de l'estomac » sont également utilisés pour se référer à l'adénocarcinome de l'estomac, y compris de la jonction gastro-œsophagienne.

Pour l'application au cancer du sein, consulter les pages 60 à 86.

Pour l'application au cancer gastrique, consulter les pages 87 à 115.

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

## Résumé et explication – Sein

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

Chez certains patients atteints d'un cancer du sein, le gène *HER2* est amplifié ; ceci faisant partie du processus de transformation maligne et de progression de la tumeur (3-8). L'amplification du gène *HER2* entraîne généralement une surexpression de la protéine HER2 à la surface des cellules cancéreuses du sein (9).

L'amplification du gène *HER2* et/ou la surexpression de sa protéine ont été montrées dans 25 à 30 % des cas de cancer du sein. Cette régulation en amont est associée à un mauvais pronostic, un risque accru de récidive et une survie écourtée. Plusieurs études ont montré que le statut de *HER2* est à mettre en corrélation avec la sensibilité ou la résistance à certains régimes de chimiothérapie (10).

La mise en évidence d'une forte surexpression de la protéine HER2 ou de l'amplification du gène *HER2* est essentielle à l'instauration d'un traitement par Herceptin™, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine HER2. Des études cliniques ont montré que ce sont les patients atteints de tumeurs dans lesquelles la protéine HER2 est surexprimée et/ou le gène *HER2* est amplifié qui bénéficient le plus d'un traitement par Herceptin™ (11).

## Principe de la procédure – Sein

Le kit *HER2* IQFISH pharmDx contient tous les principaux réactifs nécessaires pour réaliser une procédure FISH sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Après déparaffinage et réhydratation, les échantillons sont chauffés dans une solution de prétraitement, puis soumis à une digestion protéolytique utilisant de la pepsine. Après les étapes de chauffage et de digestion protéolytique, ce kit utilise un mélange de sondes IQISH non toxique prêt à l'emploi basé sur l'association des technologies PNA (acide nucléique peptidique) (12) et ADN. Ce mélange de sondes est composé d'un mélange de sondes ADN marquées au Texas Red couvrant une région de 218 kb incluant le gène *HER2* sur le chromosome 17, et d'un mélange de sondes PNA marquées à la fluorescéine ciblant la région centromérique du chromosome 17 (CEN-17).

L'hybridation spécifique sur ces deux cibles entraîne la formation d'un signal fluorescent rouge net au niveau de chaque locus du gène *HER2* et d'un signal fluorescent vert net au niveau de chaque centromère du chromosome 17. Après un lavage avec une solution stringente, les échantillons sont montés avec un milieu de montage pour la fluorescence contenant du DAPI et sont recouverts d'une lamelle de protection. À l'aide d'un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés (voir l'annexe 3), les cellules tumorales sont localisées et une numération des signaux rouges (*HER2*) et verts (CEN-17) est effectuée. Le rapport *HER2/CEN-17* est ensuite calculé. Les cellules normales dans la coupe de tissu analysée servent de contrôle positif interne de l'efficacité du prétraitement et de l'hybridation. Pour plus de détails, voir la section Interprétation de la coloration.

Pour une formation interactive en ligne, utiliser le programme de formation en ligne *HER2* IQFISH pharmDx conçu pour former rapidement et avec précision les techniciens de laboratoire, les pathologistes et les scientifiques aux techniques nécessaires à l'obtention de résultats optimaux avec le test *HER2* IQFISH pharmDx :  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Réactifs – Sein

### Matériel fourni

Le matériel répertorié ci-dessous est suffisant pour effectuer 20 tests (un test est défini comme une zone cible de 22 mm x 22 mm). Le nombre de tests est basé sur l'utilisation de 250 µL par lame du flacon 2A (5 à 8 gouttes), 10 µL par lame du flacon 3 et 15 µL par lame du flacon 5. Les solutions contenues dans les flacons 3 et 5 étant visqueuses, il peut s'avérer nécessaire de les centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse afin de recueillir tout le réactif fourni.

Le matériel contenu dans ce kit permet d'effectuer 10 cycles de coloration distincts (quatre cycles distincts en cas d'utilisation de la méthode d'immersion dans la pepsine). Le test HER2 IQFISH pharmDx est expédié avec de la carboglace. **Pour être sûr que les éléments du kit n'ont pas été exposés à des températures élevées pendant le transport, on doit trouver de la carboglace à sa réception.** Il est à noter que certains éléments du kit peuvent rester décongelés, mais cela n'affecte pas les performances du test HER2 IQFISH pharmDx.

#### Flacon 1

**PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)**

**Solution de prétraitement (20x)**

150 mL, concentrée 20x

Tampon MES (acide 2-[N-morpholino]éthanesulphonique).

#### Flacon 2A

**PEPSIN**

**Pepsine**

4 x 6,0 mL, prête à l'emploi

Solution de pepsine, pH 2,0 ; contient un stabilisateur et un agent antimicrobien.

#### Flacon 2B

**PEPSIN DILUENT (10x)**

**Diluant de la pepsine (10x)**

24 mL, concentré 10x

Tampon de dilution, pH 2,0 ; contient un agent antimicrobien.

#### Flacon 3

**HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX**

**Mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH**

0,2 mL, prêt à l'emploi

Mélange de sondes ADN HER2 marquées au Texas Red et de sondes PNA CEN-17 marquées à la fluorescéine ; fourni dans un tampon d'hybridation IQISH.

#### Flacon 4

**STRINGENT WASH BUFFER (20x)**

**Tampon de lavage stringent (20x)**

150 mL, concentré 20x

Tampon SSC (solution saline/citrate de sodium) avec un détergent (Tween-20).

#### Flacon 5

**FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM**

**Milieu de montage pour la fluorescence**

0,4 mL, prêt à l'emploi

Milieu de montage pour la fluorescence avec 500 µg/L de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

**Flacon 6****WASH BUFFER (20x)**

**Tampon de lavage (20x)**  
500 mL, concentré 20x  
Tampon Tris/HCl.

**COVERSLIP SEALANT**

**Étanchéisant pour lamelle de protection**  
1 tube, prêt à l'emploi  
Solution pour un vernissage supprimable des lamelles de protection.

**REMARQUE :** les réactifs du kit suivants, solution de prétraitement (20x), pepsine, diluant de la pepsine (10x), tampon de lavage stringent (20x), milieu de montage pour la fluorescence, tampon de lavage (20x) et étanchéisant pour lamelle de protection, sont interchangeables avec les réactifs correspondants du kit Histology FISH Accessory Kit de Dako, réf. K5799.

**Matériel requis mais non fourni****Réactifs de laboratoire**

Eau distillée ou déionisée

Éthanol à 96 %

Xylène ou substituts du xylène

**Matériel de laboratoire**

Lingettes absorbantes

**Pipettes réglables**

Thermomètre à immersion partielle étalonné (plage de température de 37 à 100 °C)

Thermomètre de surface étalonné (plage de température de 37 à 100 °C)

Lamelles de protection (22 mm x 22 mm)

Pince

Hotte de laboratoire

Bloc chauffant ou étuve à hybridation\*

Chambre d'hybridation humide\*

Microcentrifugeuse

Lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003 ou lames revêtues de poly-L-lysine (voir la section Préparation des échantillons)

Cuves ou bains de coloration

Minuteur (pouvant accepter des intervalles de 2 à 15 minutes)

Agitateur Vortex

Bain-marie avec couvercle (pouvant maintenir une température de 37 ( $\pm 2$ ) °C, 63 ( $\pm 2$ ) °C et de 95 à 99 °C)

Four à micro-ondes avec fonction de détection si le prétraitement est réalisé à l'aide d'un four à micro-ondes (voir la section B3. Protocole de coloration. Étape 1 : Prétraitement, Méthode B)

\* Tout appareillage permettant d'assurer des conditions identiques à celles décrites peut être utilisé pour la dénaturation et l'hybridation.

**Microscope et accessoires**

Filtres pour microscope à fluorescence : double filtre DAPI et FITC/Texas Red ou filtres simples FITC et Texas Red - voir l'annexe 3 pour plus de détails.

Microscope à fluorescence avec une lampe à mercure de 100 watts, une source de lumière devant être utilisée. D'autres sources de lumière sont déconseillées avec ces filtres.

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

## Précautions – Sein

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Le Stringent Wash Buffer (20x) porte la mention suivante : Fiche de données de sécurité disponible sur demande.
4. La Pepsin porte les mentions suivantes :



### Danger

Contient : une masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)

H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P304 + P340 + P310	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P301 + P310 + P331	EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Ne PAS faire vomir la personne.
P303 + P361 + P353 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P305 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

5. Le Pepsin Diluent (10x) porte les mentions suivantes :



### Danger

Contient : une masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)

H225	Liquide et vapeurs très inflammables.
H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.

H336	Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H412	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'ignition. Ne pas fumer.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P304 + P340 + P310	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P301 + P310 + P331	EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Ne PAS faire vomir la personne.
P303 + P361 + P353 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P305 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

6. Le mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* porte les mentions suivantes :



### Avertissement

Contient : dextran sulfate de sodium, carbonate d'éthylène

H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H335	Peut irriter les voies respiratoires.
H373	Peut endommager les organes suite à des expositions répétées ou prolongées.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P260	Ne pas respirer les vapeurs.
P304 + P340 + P312	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

7. Le Wash Buffer (20x) porte les mentions suivantes :

**Avertissement**

H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P264	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

8. Le Coverslip Sealant porte les mentions suivantes :

**Danger**

Contient : naphta léger (pétrole), hydrotraité

H225	Liquide et vapeurs très inflammables.
H315	Provoque une irritation cutanée.
H336	Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H411	Toxique pour les organismes aquatiques avec des effets néfastes à long terme.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'ignition. Ne pas fumer.
P241	Utiliser du matériel électrique, de ventilation, d'éclairage et de manipulation antidéflagrant.
P240	Mise à la terre et liaison équivalente du récipient et du matériel de réception.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P304 + P340	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.
P303 + P361 + P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau.
P235	Tenir au frais.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

9. Les échantillons, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux qui y ont été exposés, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection, et être éliminés avec toutes les précautions d'emploi nécessaires (13). Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les

échantillons. Si les réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.

10. Minimiser tout risque de contamination microbienne des réactifs afin d'éviter des résultats erronés.
11. Toute modification des durées et des températures d'incubation spécifiées est susceptible d'entraîner des résultats erronés.
12. Toute modification des méthodes de fixation des tissus et des épaisseurs d'échantillons spécifiées peut affecter la morphologie tissulaire et/ou l'intensité du signal.
13. Éviter l'évaporation du mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* pendant l'hybridation en assurant une humidité suffisante dans la chambre d'hybridation.
14. Les réactifs sont à la dilution optimale. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte des performances.
15. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
16. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
17. Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur le site [www.agilent.com](http://www.agilent.com) ou sur demande.
18. En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.
19. Utiliser uniquement des cuves de coloration propres pour la méthode d'immersion dans la Pepsin (étape 2, méthode C).

## **Conservation - Sein**

Conserver le mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* (flacon 3) à ≤ -18 °C dans l'obscurité. Tous les autres réactifs peuvent être conservés à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Tous les réactifs tolèrent une conservation au congélateur. Les réactifs peuvent être congelés et décongelés à dix reprises sans affecter les performances.

La pepsine, le mélange de sondes *HER2/CEN-17 IQISH* et le milieu de montage pour la fluorescence (flacons 2A, 3 et 5) peuvent s'altérer si ils sont exposés à la chaleur. Ne pas laisser ces composants à température ambiante.

Le mélange de sondes *HER2/CEN-17 IQISH* et le milieu de montage pour la fluorescence (flacons 3 et 5) peuvent s'altérer si ils sont exposés à une luminosité intense. Ne pas conserver ces éléments, ni procéder à l'analyse sous une lumière trop vive telle que la lumière du soleil.

Ne pas utiliser le kit après la date de péremption indiquée sur la boîte. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles spécifiées dans cette notice, les performances des réactifs doivent être validées par l'utilisateur (14).

Aucun signe évident n'indique l'instabilité de ce produit. Par conséquent, il est important d'évaluer les cellules normales dans la coupe de tissu analysée. Si l'on observe un profil de fluorescence inattendu qui ne peut pas être expliqué par un changement des procédures du laboratoire et que l'on soupçonne un problème avec le test *HER2 IQFISH pharmDx*, contacter l'assistance technique de Dako.

## **Préparation des échantillons – Sein**

Les échantillons provenant de biopsies, d'excisions ou de résections doivent être manipulés de manière à préserver le tissu pour l'analyse FISH. Des méthodes standard de traitement des tissus pour la coloration immunocytochimique doivent être utilisées pour tous les échantillons (15).

### **Coupes incluses en paraffine**

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

L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être comprise entre 4 et 6 µm.

Les lames nécessaires pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2* et la vérification de la présence d'une tumeur doivent être préparées au même moment. Un minimum de 2 coupes consécutives est recommandé, 1 coupe pour détecter la présence d'une tumeur colorée à l'hématoxyline et l'éosine (coloration H&E), et 1 coupe pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2*. Il est recommandé de monter les coupes de tissus sur des lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003, ou des lames revêtues de poly-L-lysine. Les échantillons doivent être analysés dans les 4 à 6 mois suivant la coupe lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (20 à 25 °C).

## **INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Sein**

### **A. Préparation des réactifs – Sein**

Il est pratique de préparer les réactifs suivants avant de procéder à la coloration :

#### **A.1 Solution de prétraitement**

Des cristaux peuvent se former dans le flacon 1, mais ils se dissolvent à température ambiante. Vérifier l'absence de cristaux avant de préparer le réactif.

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 1 (solution de prétraitement 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. La solution diluée inutilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution diluée si elle a un aspect trouble.

#### **A.2 Tampon de lavage stringent**

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 4 (tampon de lavage stringent 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué inutilisé peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter le tampon dilué s'il a un aspect trouble.

#### **A.3 Tampon de lavage**

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 6 (tampon de lavage 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué inutilisé peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter le tampon dilué s'il a un aspect trouble.

#### **A.4 Série de bains d'éthanol**

À partir d'une solution d'éthanol à 96 %, préparer 3 cuves contenant de l'éthanol à 70 %, à 85 % et à 96 % respectivement. Conserver les cuves couvertes à température ambiante ou entre 2 et 8 °C, et les utiliser pour un maximum de 200 lames. Jeter les solutions si elles ont un aspect trouble.

#### **A.5 Solution de pepsine**

Une solution de pepsine n'est nécessaire qu'en cas d'utilisation de la méthode d'immersion dans la pepsine (méthode C).

Préparer la solution de pepsine comme suit :

Pour un récipient pouvant contenir six lames, préparer 60 mL de solution de pepsine :

Ajouter 48 mL d'eau distillée ou déionisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans le récipient.

Ajouter 6 mL de diluant de la pepsine (10x) froid (2 à 8 °C) (flacon 2B) dans le récipient.

Ajouter 6 mL de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) dans le récipient.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 (±2) °C dans un bain-marie.

Pour un récipient pouvant contenir 24 lames, préparer 240 mL de solution de pepsine :

Ajouter 192 mL d'eau distillée ou déionisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans le récipient.

Ajouter 24 mL de diluant de la pepsine (10x) froid (2 à 8 °C) (flacon 2B) dans le récipient.

Ajouter 24 mL de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) dans le récipient.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 (±2) °C dans un bain-marie.

La solution de pepsine ramenée à la bonne température doit être utilisée dans les 5 heures.

## B. Procédure de coloration – Sein

### B.1 Remarques sur la procédure

L'utilisateur doit lire attentivement les présentes instructions et se familiariser avec tous les composants avant utilisation (voir la section Précautions).

Tous les réactifs doivent être ramenés à la bonne température comme suit avant d'être utilisés :

**Flacon 1** : la solution de prétraitement diluée doit être ramenée à une température comprise entre **95 et 99 °C** si un bain-marie est utilisé pour le prétraitement (section B3. Protocole de coloration, Étape 1 : Prétraitement, Méthode A). Si un four à micro-ondes avec fonction de détection est utilisé pour le prétraitement (section B3. Protocole de coloration, Étape 1 : Prétraitement, Méthode B), la solution de prétraitement diluée doit être ramenée à température ambiante, entre 20 et 25 °C.

**Flacon 2A** : la pepsine doit être appliquée entre **2 et 8 °C** (section B3, Protocole de coloration, Étape 2 : Méthodes A et B) et elle doit rester constamment froide.

**Flacon 2B** : le diluant de la pepsine (10x) doit être appliqué entre **2 et 8 °C** (section B3, Protocole de coloration, Étape 2 : Méthode C).

**Flacon 3** : le mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* se sépare en deux phases lorsqu'il est conservé à ≤ -18 °C. Avant d'utiliser le flacon 3, s'assurer que le tampon ne présente qu'une seule phase en équilibrant le mélange de sondes à température ambiante (**20-25 °C**) puis en le mélangeant. Décongeler le flacon 3 à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes maximum (à l'abri de toute lumière vive), puis agiter vigoureusement le flacon pendant 15 secondes à 2 500 tr/min en utilisant un mélangeur Vortex. Stocker le flacon 3 à ≤ -18 °C immédiatement après utilisation.

**Flacon 4** : tampon de lavage stringent dilué ; une cuve doit être ramenée à température ambiante et une autre à une température de **63 (±2) °C** avant utilisation.

**Flacon 5** : le milieu de montage pour la fluorescence peut être appliqué à n'importe quelle température comprise entre **2 et 25 °C**.

**Flacon 6** : le tampon de lavage dilué doit être ramené à température ambiante (**20 à 25 °C**).

**L'étanchéisant pour lamelle de protection** peut être appliqué à n'importe quelle température comprise entre **2 et 25 °C**.

### Toutes les étapes doivent être réalisées à la température indiquée.

La procédure comprend plusieurs déshydratations suivies d'un séchage des coupes de tissus. S'assurer que les coupes de tissus sont complètement sèches avant de passer à l'étape suivante. Ne pas laisser les coupes de tissus se dessécher pendant les autres étapes de la procédure.

Si la procédure de coloration doit être interrompue, les lames peuvent être conservées dans le tampon de lavage après l'étape de déparaffinage pendant une (1) heure maximum à température ambiante (20 à 25 °C) sans que cela n'affecte les résultats.

### B.2 Traitement des tissus avant la coloration

**Déparaffinage et réhydratation** : avant de réaliser l'analyse, les lames de tissus doivent être déparaffinées afin d'éliminer le milieu d'inclusion, puis réhydratées. Éviter toute élimination incomplète de la paraffine. Tout résidu de milieu d'inclusion provoque une augmentation de la coloration non spécifique. Cette étape doit être réalisée à température ambiante (20 à 25 °C).

1. Placer les lames dans un bain de xylène et laisser incuber pendant 5 minutes (±1 minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.
2. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans de l'éthanol à 96 % pendant 2 minutes (±1 minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.
3. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans de l'éthanol à 70 % pendant 2 minutes (±1 minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.

4. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans le tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant au moins 2 minutes. Commencer la procédure de coloration comme indiqué dans la section B.3, Étape 1, Prétraitement.

Les solutions de xylène et d'alcool doivent être renouvelées au maximum toutes les 200 lames. Des substituts du xylène peuvent être utilisés.

**REMARQUE :** les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été conçus pour des performances optimales. Une dilution supplémentaire des réactifs ou une modification des températures d'incubation peuvent entraîner des résultats erronés ou discordants. Toute différence dans le traitement des tissus ou dans les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur peut invalider les résultats du test.

## B.3 Protocole de coloration

### Étape 1 : prétraitement

Le prétraitement peut être réalisé soit en utilisant un bain-marie, comme décrit dans la méthode A), soit en utilisant un four à micro-ondes avec fonction de détection, comme décrit dans la méthode B).

#### Méthode A : prétraitement en utilisant un bain-marie

Remplir les cuves de coloration, par ex. cuves de Coplin, de solution de prétraitement diluée (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.1). Placer les cuves de coloration contenant la solution de prétraitement diluée dans un bain-marie. Chauffer le bain-marie et la solution de prétraitement entre 95 et 99 °C. Vérifier la température à l'intérieur de la cuve à l'aide d'un thermomètre étalonné pour s'assurer que la température est correcte. Recouvrir les cuves avec des couvercles afin de stabiliser la température et d'éviter toute évaporation.

Immerger les coupes déparaffinées se trouvant à température ambiante dans les cuves de coloration contenant la solution de prétraitement préchauffée. Vérifier à nouveau la température et laisser incuber pendant 10 minutes ( $\pm 1$  minute) entre 95 et 99 °C.

Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie. Retirer le couvercle et laisser les lames refroidir dans la solution de prétraitement pendant 15 minutes à température ambiante.

Transférer les lames dans une cuve contenant le tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

**REMARQUE :** la solution de prétraitement est conçue pour une seule application. Ne pas la réutiliser.

#### Méthode B : prétraitement en utilisant un four à micro-ondes avec fonction de détection

Remplir une cuve en plastique de solution de prétraitement diluée à température ambiante (20 à 25 °C). Immerger les coupes déparaffinées dans la solution de prétraitement, recouvrir la cuve d'un couvercle percé et la placer dans le four à micro-ondes. Sélectionner la fonction de détection de l'ébullition ainsi qu'un programme qui s'exécute pendant 10 minutes après avoir atteint la température d'ébullition\*.

Après les 10 minutes d'incubation, sortir la cuve contenant les lames du four. Retirer le couvercle et laisser refroidir pendant 15 minutes à température ambiante. Transférer les lames dans une cuve contenant du tampon de lavage dilué et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C). Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

\* L'utilisation d'un four à micro-ondes avec fonction de détection signifie que le four doit être doté d'un capteur et de programmes qui chauffent d'abord la solution de prétraitement jusqu'à son point d'ébullition puis maintiennent la température de prétraitement requise (supérieure à 95 °C) tout en décomptant le temps préréglé (10 minutes ( $\pm 1$  minute)). Il est possible que certains modèles de fours à micro-ondes avec fonction de détection ne permettent pas de choisir le temps de chauffage. Si le modèle comprend uniquement des programmes prééglés, s'assurer de sélectionner un programme qui maintient la température de prétraitement requise (supérieure à 95 °C) pendant au moins 10 minutes ( $\pm 1$  minute) et arrêter manuellement le programme après 10 minutes ( $\pm 1$  minute).

**REMARQUE :** la solution de prétraitement est conçue pour une seule application. Ne pas la réutiliser.

### **Étape 2 : pepsine, prête à l'emploi ou solution de pepsine**

L'incubation de la pepsine peut être réalisée en déposant directement sur les lames des gouttes de pepsine prête à l'emploi, soit à température ambiante (20 à 25 °C) (Méthode A), soit à 37 °C (Méthode B). La seconde option consiste à immerger les lames dans une solution de pepsine et à les laisser incuber à 37 ( $\pm 2$ ) °C (Méthode C).

#### Méthode A et méthode B :

Éliminer l'excès de tampon en tapotant. À l'aide d'un tissu non pelucheux (ex. : lingette absorbante ou tampon de gaze), essuyer soigneusement le pourtour de l'échantillon pour enlever tout liquide restant et pour garder les réactifs à l'intérieur de la zone prescrite.

Déposer 5 à 8 gouttes (250 µL) de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) pour recouvrir l'échantillon. La pepsine doit toujours être conservée entre 2 et 8 °C.

#### Méthode A : pepsine prête à l'emploi - incubation entre 20 et 25 °C

Laisser incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 5 à 15 minutes. Une durée d'incubation de 5 à 15 minutes convient à la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation du tissu et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et elle doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage dilué et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

#### Méthode B : pepsine prête à l'emploi - incubation à 37 °C

Placer l'échantillon avec la pepsine sur un bloc chauffant à 37 °C et incuber pendant 3 à 5 minutes. Une durée d'incubation de 3 à 5 minutes convient pour la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation des tissus et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser les coupes de tissus sécher complètement à l'air libre.

#### Méthode C : solution de pepsine - immersion des lames dans une solution de pepsine à 37 °C

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer quatre cycles distincts (60 mL de solution de pepsine, petit récipient pour six lames) ou un seul cycle (240 mL de solution de pepsine, grand récipient pour 24 lames). Préparer la solution de pepsine comme indiqué à la section A.5.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 ( $\pm 2$ ) °C dans un bain-marie. S'assurer que la température s'est stabilisée. Mesurer la température à l'intérieur du récipient à l'aide d'un thermomètre étalonné afin de s'assurer que la température est correcte.

Éliminer l'excès de tampon de lavage en tapotant. Immerger les lames dans la solution de pepsine à 37 ( $\pm 2$ ) °C et laisser incuber pendant 20 à 30 minutes. Une durée d'incubation de 20 à 30 minutes convient à la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation du tissu et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et elle doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de solution de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser les coupes de tissus sécher complètement à l'air libre.

### Étape 3 : mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH

Le mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH se sépare en deux phases lorsqu'il est conservé à  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ . Avant d'utiliser le flacon 3, s'assurer de la présence d'une seule phase en ramenant le mélange de sondes à température ambiante ( $20 \text{ à } 25^{\circ}\text{C}$ ), puis en le mélangeant. Décongeler le flacon 3 à température ambiante ( $20 \text{ à } 25^{\circ}\text{C}$ ) pendant 30 minutes maximum (à l'abri d'une lumière intense), puis agiter vigoureusement le flacon pendant 15 secondes à 2 500 tr/min en utilisant un agitateur Vortex. Replacer le flacon 3 à  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  immédiatement après utilisation. Déposer 10  $\mu\text{L}$  de mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH (flacon 3) au centre de la coupe de tissu. Placer immédiatement une lamelle de protection en verre de 22 mm x 22 mm sur le mélange de sondes et laisser celui-ci s'étaler de manière homogène sous la lamelle. Éviter la formation de bulles d'air. En cas de formation de bulles d'air, les éliminer du tissu en tapotant doucement avec une pince.

### Ne pas oublier de replacer le flacon 3 à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ immédiatement après utilisation.

Sceller la lamelle de protection avec du Coverslip Sealant en éjectant l'étanchéisant sur le pourtour de la lame. Laisser le Coverslip Sealant dépasser de la lamelle de protection et de la lame pour former un joint autour de la lamelle. S'assurer que le Coverslip Sealant recouvre bien tout le bord de la lamelle de protection.

Placer les lames sur une surface métallique ou en pierre plate (bloc chauffant ou bloc dans un four d'hybridation) préchauffée à  $66 (\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Dénaturer pendant exactement 10 minutes. Placer les lames dans une chambre d'hybridation humide préchauffée. Couvrir la chambre d'un couvercle et incuber à  $45 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  pendant 60 à 120 minutes\*. Noter qu'une température d'hybridation de  $37^{\circ}\text{C}$  ne convient pas aux sondes contenues dans ce kit.

\* Tout appareillage permettant d'assurer des conditions identiques à celles décrites ci-dessus peut être utilisé pour la dénaturation et l'hybridation.

### Étape 4 : lavage stringent

Remplir deux cuves de coloration, par ex. cuves de Coplin, de tampon de lavage stringent dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.2). Un volume minimum de 100 mL ou 15 mL par lame dans chaque cuve est recommandé.

Placer l'une des cuves de coloration contenant le tampon de lavage stringent dilué à température ambiante dans une hotte de laboratoire et l'autre dans un bain-marie. Chauffer le bain-marie et le tampon de lavage stringent dilué à  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . S'assurer que la température s'est stabilisée. Recouvrir la cuve avec un couvercle pour stabiliser la température et éviter toute évaporation. Mesurer la température à l'intérieur de la cuve se trouvant au bain-marie à l'aide d'un thermomètre étalonné afin de s'assurer que la température est correcte. Le tampon de lavage stringent contient un détergent et peut se troubler à  $63^{\circ}\text{C}$  ; ceci n'affecte pas les performances.

À l'aide d'une pince ou de gants, sortir les lames de la chambre d'hybridation et retirer avec précaution l'étanchéisant ainsi que les lamelles de protection, puis placer les lames les unes après les autres dans la cuve de prélavage ramenée à température ambiante.

Une fois toutes les lamelles de protection retirées, transférer les lames de la cuve de prélavage à température ambiante dans la cuve à  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  se trouvant dans le bain-marie.

Immédiatement après avoir transféré les lames dans le tampon de lavage stringent dilué à  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  se trouvant dans le bain-marie, faire démarrer le minuteur. Effectuer un lavage stringent pendant exactement 10 minutes.

Retirer les lames du tampon de lavage stringent dilué et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante ( $20 \text{ à } 25^{\circ}\text{C}$ ).

Renouveler le tampon de lavage dilué et faire tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser sécher complètement les coupes de tissus.

### Étape 5 : montage

Déposer 15 µL de milieu de montage pour la fluorescence contenant du DAPI (flacon 5) sur la zone cible de la lame et poser une lamelle de protection en verre.

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

## Contrôle de qualité – Sein

1. Les signaux doivent être de couleur vive, bien distincts et faciles à évaluer.
2. Les cellules normales permettent d'effectuer un contrôle interne du cycle de coloration.
  - Les cellules normales doivent présenter 1 à 2 signaux verts clairement visibles, indiquant que la sonde PNA CEN-17 s'est bien hybridée à la région centromérique du chromosome 17.
  - Les cellules normales doivent également présenter 1 à 2 signaux rouges clairement visibles, indiquant que la sonde ADN *HER2* s'est bien hybridée à l'amplicon *HER2*.
  - À cause de la coupe du tissu, certaines cellules normales ne présenteront pas 2 signaux de chaque couleur, mais moins.
  - L'absence de détection de signaux dans les cellules normales indique que le test a échoué et les résultats doivent être considérés comme non valides.
3. La morphologie nucléaire doit être intacte lors d'une évaluation à l'aide d'un filtre DAPI. La présence de nombreuses cellules fantômes et une mauvaise morphologie nucléaire générale indiquent une digestion trop forte de l'échantillon, qui peut avoir pour effet une perte ou une fragmentation des signaux. De tels échantillons doivent être considérés comme non valides.
4. Des différences dans la fixation, le traitement ou l'inclusion du tissu dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent produire des variations dans les résultats, ce qui exige une évaluation régulière de contrôles internes.

## Interprétation de la coloration – Sein

### Tissus pouvant être évalués

Seuls les échantillons de patients atteints de carcinomes invasifs doivent être analysés. Dans les cas de carcinome *in situ* et de carcinome invasif dans le même échantillon, seul le composant invasif doit être évalué. Éviter les zones de nécrose et celles où les limites nucléaires sont ambiguës. Ne pas inclure les noyaux réclamant un jugement subjectif. Ne pas inclure les noyaux avec un signal de faible intensité et une coloration de fond non spécifique ou importante.

**Numération des signaux :** localiser la tumeur dans le contexte de la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine et évaluer la même zone sur la lame colorée par la procédure FISH. Scanner plusieurs zones des cellules tumorales pour prendre en compte toute hétérogénéité possible. Sélectionner une zone présentant une bonne répartition des noyaux. Commencer l'analyse dans le coin supérieur gauche de la zone sélectionnée puis, en scannant de gauche à droite, compter le nombre de signaux dans les limites nucléaires de chaque noyau évalué conformément aux recommandations ci-dessous (voir aussi l'annexe 3).

- Faire la mise au point afin de trouver tous les signaux dans chaque noyau.

- Compter deux signaux de même taille et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comme un seul signal.
- Dans les noyaux présentant de forts niveaux d'amplification du gène *HER2*, les signaux *HER2* peuvent se trouver très proches les uns des autres et former un agrégat de signaux. Dans ce cas, le nombre de signaux *HER2* ne peut pas être compté mais doit être estimé. Faire particulièrement attention aux signaux verts, car les agrégats de signaux *HER2* peuvent masquer les signaux verts et les rendre impossible à voir. En cas de doute, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique.

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

### Guide de décompte des signaux

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

Noter le décompte dans un tableau tel que celui donné dans l'annexe 2.

Compter 20 noyaux par échantillon tissulaire, si possible à partir de zones tumorales distinctes (17).

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

Les échantillons ayant un rapport *HER2/CEN-17* supérieur ou égal à 2 doivent être considérés comme présentant une amplification du gène *HER2* (5, 17-19).

Les résultats se trouvant à la valeur seuil ou proches de la valeur seuil (1,8 à 2,2) doivent être interprétés avec prudence.

Si le rapport se situe à la limite (1,8 à 2,2), compter 20 noyaux de plus et recalculer le rapport pour les 40 noyaux.

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

## **Limitations – Sein**

1. L'analyse FISH est un procédé en plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée pour la sélection des réactifs appropriés, la sélection des tissus, la fixation et le traitement, la préparation des lames FISH et l'interprétation des résultats de la coloration.
2. Les résultats de l'analyse FISH dépendent de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Les fixation, lavage, séchage, chauffage ou coupe incorrects, ou bien une contamination par d'autres tissus ou liquides peuvent avoir une influence sur l'hybridation de la ou des sonde(s). Des résultats non cohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion ou à des irrégularités inhérentes au tissu.
3. Pour des résultats optimaux et reproductibles, les lames de tissus doivent être entièrement déparaffinées. L'élimination de la paraffine doit être terminée avant le début du processus de coloration. (Voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section B.2).
4. Utiliser uniquement un bain-marie, un bloc chauffant et une étuve à hybridation à température étalonnée. L'utilisation d'autres types de matériel peut entraîner l'évaporation du mélange de sondes *HER2/CEN-17 IQISH* au cours de l'hybridation et celle-ci doit être validée par l'utilisateur.

## Caractéristiques de performance – Sein

### Sensibilité analytique

La sensibilité du mélange de sondes *HER2/CEN-17* IQISH a été vérifiée en utilisant 18 échantillons d'épithélium mammaire humain sain. Le rapport entre le nombre de signaux *HER2* et de signaux CEN-17 a été calculé sur la base du décompte de 20 noyaux par échantillon.

Le rapport *HER2/CEN-17* pour les 18 échantillons d'épithélium mammaire sain se situait entre 0,97 et 1,08.

### Spécificité analytique

Les extrémités des sondes ADN *HER2* du mélange de sondes *HER2/CEN-17* ont été séquencées et les sondes cartographiées afin de confirmer qu'elles couvrent 218 kb au total, y compris le gène *HER2*.

Les sondes PNA CEN-17 du mélange de sondes *HER2/CEN-17* IQISH ont été testées individuellement et en combinaison, afin de confirmer leur hybridation spécifique à la région centromérique du chromosome 17.

Pour mesurer la capacité du test à n'identifier que les substances ciblées *HER2* et CEN-17 sans aucune interférence de la part d'autres substances, des études ont été réalisées sur des échantillons tissulaires d'épithélium mammaire humain sain en utilisant le flacon 3 contenant le tampon d'hybridation mais sans le mélange de sondes. Un total de 18 échantillons a été évalué pour vérifier la présence de signaux qui ne sont pas liés au mélange de sondes. Aucune détection d'autres chromosomes ciblés ni aucune interférence avec des substances étroitement liées n'ont été observées dans aucun des 18 échantillons.

### Études de robustesse

La robustesse du test *HER2* IQFISH pharmDx a été testée en variant la durée du prétraitement, la température et les méthodes de chauffage du tampon de prétraitement (four à micro-ondes ou bain-marie), la durée et la méthode d'incubation dans la pepsine (pepsine prête à l'emploi ou immersion), la température et la durée de dénaturation, la durée d'hybridation et la durée et la température du lavage stringent.

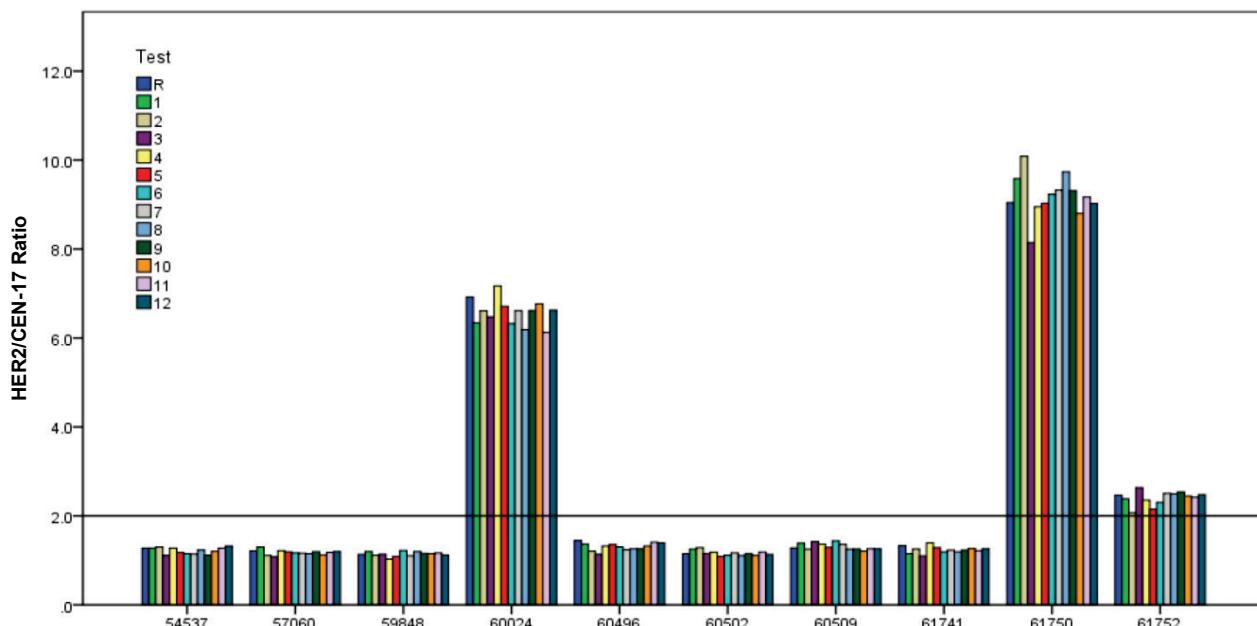
Aucune différence significative n'a été observée au niveau des résultats dans les conditions expérimentales suivantes :

- Prétraitement Méthode A) Bain-marie pendant 10 minutes combiné à des températures de 95 °C, 95 à 99 °C et 99 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes de 95 à 99 °C
- Prétraitement Méthode B) Four à micro-ondes pendant 9, 10 et 11 minutes à >95 °C.
- Digestion par la pepsine Méthode A) avec des durées d'incubation de 5, 10 et 15 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).
- Digestion par la pepsine Méthode B) avec des durées d'incubation de 3, 4 et 5 minutes à 37 °C.
- Digestion par la pepsine Méthode C) avec des durées d'incubation de 20, 25 et 30 minutes combinée à des températures de 35, 37 et 39 °C.
- Dénaturation pendant 10 minutes combinée à des températures de 65, 66 et 67 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes à 66 °C. Durée d'hybridation de 60, 90 et 120 minutes à 45 °C.
- Lavage stringent pendant 10 minutes combiné à des températures de 61, 63 et 65 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes à 63 °C.

**Remarque :** pour les tests de robustesse, seul un paramètre de la procédure de coloration a été modifié à la fois tandis que les autres paramètres ont été conservés. Il est recommandé de respecter les durées et les températures indiquées dans la procédure de coloration.

L'hybridation de 60 minutes a produit un signal de forte intensité, bien que légèrement en deçà par rapport à une hybridation d'une durée de 90 et 120 minutes. Aucune différence significative n'a été observée au niveau des résultats avec les autres combinaisons de durée et de température.

La procédure de coloration pour le test *HER2* IQFISH pharmDx présente des variables de protocole au niveau du chauffage de la solution de prétraitement, de la digestion par la pepsine et de la durée d'hybridation. Chaque combinaison possible et unique a été validée pour ce qui concerne le statut du gène *HER2*. La validation a été effectuée sur 10 échantillons de carcinome mammaire humain fixés au formol et inclus en paraffine pour chacune des 12 combinaisons possibles. Le kit *HER2* FISH pharmDx (réf. K5331) a été pris pour référence. Le rapport *HER2/CEN-17* pour chaque échantillon individuel est indiqué à la figure 1. Des tabulations croisées entre les 12 tests et la coloration de référence ont montré une concordance globale au niveau du statut du gène *HER2* de 100 % (10/10), avec un intervalle de confiance bilatéral à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 78,3 % et 100 % respectivement. La valeur Kappa était de 1,00 et le test de McNemars a montré une absence de biais (valeur p bilatérale de 1,00).



**Figure 1** Rapports individuels *HER2/CEN-17* pour 10 échantillons de carcinome mammaire humain colorés en utilisant les 12 variations de combinaison de protocole possibles avec le kit *HER2* IQFISH pharmDx (réf. K5731) (tests 1 à 12) et le kit de référence *HER2* FISH pharmDx (réf. K5331) (R). La ligne horizontale illustre la valeur seuil de 2,0.

### Répétabilité

La répétabilité du rapport *HER2/CEN-17* a été étudiée en utilisant le test *HER2* IQFISH pharmDx à l'aide coupes consécutives de neuf échantillons de carcinome mammaire humain ayant un statut du gène *HER2* amplifié ou non amplifié. Des coupes de chaque échantillon en triple exemplaire ont été testées au cours du même cycle. Le coefficient de variation moyen était de 5,2 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 1 % à 8 %) et de 14 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 7 % à 20 %).

Au total, cinq coupes consécutives de quatre échantillons de carcinome mammaire humain présentant différentes épaisseurs (3, 4, 5, 6 et 7 µm) ont été testées avec le test *HER2* IQFISH pharmDx. Le coefficient de variation moyen du rapport *HER2/CEN-17* était de 7 % (plage allant de 6 % à 9 %).

### Reproductibilité

La reproductibilité inter-lots et inter-observateurs du test *HER2* IQFISH pharmDx a été testée en utilisant trois lots de *HER2* IQFISH pharmDx et trois observateurs. La reproductibilité a été testée sur neuf échantillons de carcinome mammaire humain distincts ayant un statut du gène *HER2* non amplifié ou amplifié.

Le coefficient de variation moyen pour la reproductibilité inter-lots était de 5 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 2 % à 8 %) et de 7,8 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 5 % à 11 %).

Le coefficient de variation moyen pour la reproductibilité inter-observateurs était de 3,2 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 0,2 % à 6 %) et de 2,8 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 2 % à 4 %).

### Utilité clinique

L'utilité clinique du kit *HER2* FISH pharmDx de Dako (réf. K5331) a été étudiée lors d'une étude comparative avec le kit PathVysis™ HER-2 DNA Probe de Vysis. L'étude incluait 150 échantillons archivés de patients présentant un cancer du sein de stade II ou III, à ganglions positifs ou à ganglions négatifs.

L'objectif principal de cette étude était de vérifier le degré de concordance entre les rapports *HER2*/centromère du chromosome 17 des 150 échantillons testés avec les kits Dako et Vysis, à la fois sur le plan de la concordance générale des rapports et de celle des résultats FISH dichotomisés (groupes +/-).

Au total, 145 échantillons ont été hybridés et évalués avec succès, et étaient donc éligibles pour l'analyse statistique. Le tableau 1 présente une tabulation croisée 2 x 2 des résultats.

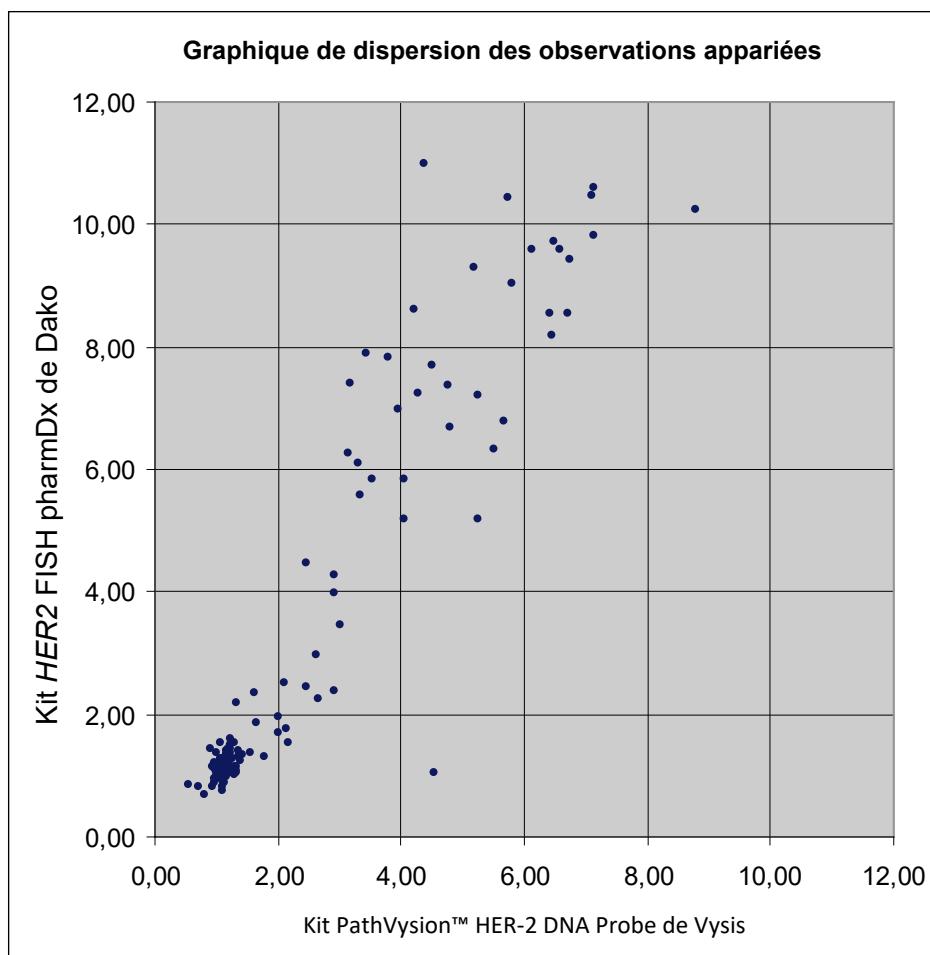
**Tableau 1. Résultats dichotomisés de 145 échantillons de cancer du sein testés avec le kit *HER2* FISH pharmDx Kit de Dako et avec le kit PathVysis™ HER-2 DNA Probe de Vysis. 60 noyaux ont été évalués dans chaque échantillon avec chacun des deux kits.**

	Kit Dako (-) amplifié	Kit Dako (+) amplifié	Somme
Kit Vysis (-) amplifié	95	2	97
Kit Vysis (+) amplifié	5	43	48
Somme	100	45	145

La concordance entre les tests Dako et Vysis était de 95 % avec un intervalle de confiance de 92 à 99 %. La valeur kappa était 0,89.

Le test de McNemars sur le biais systématique entre les deux tests n'était pas significatif ( $p=0,22$ ).

La figure 2 présente un graphique de dispersion (nuage de points) des observations appariées pour les 145 échantillons.



**Figure 2.** 145 échantillons de cancer du sein testés pour l'amplification du gène *HER2* avec le kit *HER2 FISH pharmDx* de Dako et le kit *PathVysion™ HER-2 DNA Probe* de Vysis. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport *HER2/centromère du chromosome 17*. 60 noyaux ont été évalués dans chaque échantillon avec chacun des deux kits.

La concordance générale entre les tests *HER2 FISH pharmDx* de Dako et *PathVysion™ HER-2 DNA Probe* de Vysis a été vérifiée par une analyse des différences entre les observations appariées de log (rapport) et une analyse de régression linéaire de log (rapport) des deux tests. La conclusion est que la différence entre les observations appariées de log (rapport) est systématiquement augmentée de la somme des rapports *HER2/centromère du chromosome 17* et qu'en ce qui concerne les rapports les plus élevés, le rapport mesuré est plus élevé dans le test Dako que dans le test Vysis.

Le rapport *HER2/centromère du chromosome 17* plus élevé observé dans le test avec le kit *HER2 FISH pharmDx* de Dako peut être lié à une différence réelle entre les deux tests, par ex. une résolution plus élevée du kit *HER2 FISH pharmDx* de Dako donne des rapports également plus élevés dans les cas de forte amplification du gène *HER2*. Cependant, les kits ont été testés sur 2 sites différents et un écart entre les laboratoires est à prévoir. De plus, un écart plus important dans les cas de forte amplification, qui n'est pas considéré comme cliniquement pertinent, est mentionné dans la littérature (18). L'étude actuelle ne permet pas l'investigation d'une différence systématique entre les deux tests dans plusieurs laboratoires. Il faut ajouter que l'écart observé entre les deux tests est d'une importance similaire à celui observé entre sites dans l'étude de transférabilité.

Le kit *HER2 IQFISH pharmDx* de Dako (réf. K5731) a été comparé avec le kit *HER2 FISH pharmDx* de Dako (réf. K5331) dans une étude comparative portant sur 78 échantillons tissulaires de carcinome mammaire humain. La tabulation croisée du statut de *HER2* obtenue par les deux tests a produit une concordance globale de 98,7 % avec un intervalle de confiance à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 94,2 % et à 99,9 %. La valeur Kappa était de 0,96 avec un

intervalle de confiance à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 0,89 et à 1,00. La valeur p du test de McNemars était de 1,00, indiquant une absence de biais entre les deux tests.

**Dépannage – Sein**

<b>Problème</b>	<b>Cause probable</b>	<b>Mesure suggérée</b>
1. Aucun signal ou signaux de faible intensité	1a. Le kit a été exposé à des températures élevées pendant le transport ou la conservation  1b. Le microscope ne fonctionne pas correctement <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mauvais jeu de filtres</li> <li>- Lampe inadaptée</li> <li>- Lampe à mercure trop vieille</li> <li>- Lentilles du collecteur sales et/ou fissurées</li> <li>- Huile à immersion inadaptée</li> </ul> 1c. Signaux atténués  1d. Mauvaises conditions de prétraitement  1e. Évaporation du mélange de sondes pendant l'hybridation	1a. Vérifier les conditions de conservation. S'assurer qu'il y avait de la carboglace à la réception des colis. S'assurer que le flacon 3 a été conservé à l'abri de la lumière, à ≤ -18 °C. S'assurer que les flacons 2A et 5 ont été conservés à l'abri de la lumière, entre 2 et 8 °C maximum.  1b. Vérifier le microscope et s'assurer que les filtres utilisés sont adaptés aux fluorochromes du kit, que la lampe à mercure est adaptée et qu'elle n'a pas été utilisée au-delà de sa durée de vie prévue. (voir l'annexe 3). En cas de doute, contacter le distributeur local du microscope.  1c. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition aux sources de lumière intense.  1d. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.  1e. Assurer une humidité suffisante dans la chambre d'hybridation.
2. Aucun signal vert	2a. Mauvaises conditions du lavage stringent	2a. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le lavage stringent sont bien respectées et que les lamelles de protection sont retirées avant le lavage stringent.
3. Aucun signal rouge	3a. Mauvaises conditions de prétraitement	3a. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.
4. Zones sans aucun signal	4a. Volume de sondes insuffisant	4a. Veiller à ce que le volume de sondes soit suffisant pour recouvrir la zone sous la lamelle de protection.

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
	4b. Formation de bulles d'air pendant l'application du mélange de sondes ou pendant le montage	4b. Éviter la formation de bulles d'air. Si des bulles sont observées, les éliminer en tapotant doucement à l'aide d'une pince.
5. Coloration de fond excessive	5a. Mauvaise fixation du tissu  5b. Élimination incomplète de la paraffine  5c. Température du lavage stringent trop basse  5d. Exposition prolongée de la coupe hybridée à une lumière intense	5a. S'assurer que seules des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine sont utilisées.  5b. Suivre les procédures de déparaffinage et de réhydratation décrites dans la section B.2.  5c. S'assurer que la température du lavage stringent est de 63 ( $\pm 2$ ) °C.  5d. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition à la lumière intense
6. Mauvaise morphologie tissulaire	6a. Mauvais traitement à la pepsine  6b. De mauvaises conditions de prétraitement peuvent provoquer un aspect trouble ou laiteux  6c. Un traitement à la pepsine trop long ou des coupes très fines peuvent faire apparaître des cellules fantômes ou convexes.	6a. Respecter les durées d'incubation recommandées pour la pepsine. Voir la section B.3, étape 2. S'assurer que la pepsine est manipulée à la bonne température. Voir la section B.1.  6b. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.  6c. Raccourcir la durée d'incubation dans la pepsine. Voir la section B.3, étape 2. S'assurer que l'épaisseur des coupes est de 4 à 6 µm.
7. Niveau élevé d'autofluorescence verte sur la lame, y compris dans les zones sans tissu fixé au formol et inclus en paraffine	7. Utilisation de lames de verre périmées ou déconseillées	7. S'assurer que la date de péremption des lames de verre revêtues (lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003, ou lames revêtues de poly-L-lysine) n'a pas été dépassée.

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

**Annexe 1 – Sein****HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731**

## Liste de contrôle du protocole

ID du registre du cycle de coloration : \_\_\_\_\_

Date du cycle : \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731, lot : \_\_\_\_\_

ID de l'échantillon : \_\_\_\_\_

ID du matériel : \_\_\_\_\_

Date de dilution/de péremption du tampon de lavage 1x (flacon 6 dilué au 1/20ème) : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Tissu fixé au formol neutre tamponné	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
--------------------------------------	------------------------------	------------------------------

<b>Étape 1 : prétraitement</b>		
Date de dilution/de péremption de la solution de prétraitement (flacon 1 dilué au 1/20ème)	/	
Température mesurée de la solution de prétraitement (95 à 99 °C) si le chauffage se fait au bain-marie		°C
Prétraitement (10 minutes) et refroidissement (15 minutes)		
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)		
<b>Étape 2 : pepsine</b>		
Durée du traitement à la pepsine (flacon 2A) à 37 °C ou		minutes
Durée du traitement à la pepsine (flacon 2A) à température ambiante (20-25 °C) ou		minutes
Durée de l'immersion dans la pepsine à 37 ( $\pm 2$ ) °C		minutes
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)		
Déshydratation des lames (3 x 2 minutes) dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées et séchage à l'air libre		
<b>Étape 3 : mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH</b>		
Application du mélange de sondes (flacon 3), mise en place d'une lamelle et étanchéisation avec de l'étanchéisant pour lamelle de protection		
Température mesurée de la dénaturation (66 ( $\pm 1$ ) °C)		°C
Dénaturation pendant 10 minutes		
Température mesurée de l'hybridation (45 ( $\pm 2$ ) °C)		°C
Durée d'hybridation (60 à 120 minutes)		minutes
<b>Étape 4 : lavage stringent</b>		
Date de dilution/de péremption du tampon de lavage stringent (flacon 4 dilué au 1/20ème)	/	
Température mesurée du tampon de lavage stringent (63 ( $\pm 2$ ) °C)		°C
Lavage stringent (10 minutes) après retrait des lamelles de protection		
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)		°C
Déshydratation des lames (3 x 2 minutes) dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées et séchage à l'air libre.		minutes

**Étape 5 : montage**

Application de 15 µL de milieu de montage pour la fluorescence (flacon 5) et mise en place d'une lamelle de protection

Commentaires : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Date et signature du technicien : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Annexe 2 – Sein*****HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731*****Schéma d'évaluation**

ID du registre du cycle de coloration : \_\_\_\_\_

Date du cycle : \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731, lot : \_\_\_\_\_ ID de l'échantillon : \_\_\_\_\_

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

Pour déterminer le rapport HER2/CEN-17, compter le nombre de signaux HER2 et celui des signaux CEN-17 dans les 20 mêmes noyaux et diviser le nombre total de signaux HER2 par le nombre total de signaux CEN-17. Si le rapport HER2/CEN-17 se situe à la limite (1,8 à 2,2), compter 20 noyaux de plus et recalculer le rapport.

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

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

- Rapport < 2 : aucune amplification du gène HER2 observée
- Rapport ≥ 2 : amplification du gène HER2 observée

Date et signature du technicien : \_\_\_\_\_

Date et signature du pathologiste : \_\_\_\_\_

*Pour des recommandations sur l'évaluation : voir la section Interprétation de la coloration.*

## Annexe 3 – Sein

### **HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731**

#### **Spécifications du microscope à fluorescence**

**Dako recommande le matériel suivant pour une utilisation avec le test HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731 :**

#### **1. Type de microscope**

- Microscope à épifluorescence.

#### **2. Lampe**

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

#### **3. Objectifs**

- Pour le passage en revue rapide du tissu, des objectifs de fluorescence secs 10X ou à immersion d'huile 16X conviennent.
- Pour un fort grossissement et l'évaluation des signaux, seuls des objectifs de fluorescence à immersion d'huile, par ex. 100X, sont recommandés.

#### **4. Filtres**

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

- Filtre DAPI
- Filtre double Texas Red/FITC
- Les filtres Texas Red et FITC simples peuvent être utilisés pour la confirmation.

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

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

#### **5. Huile**

- Huile non fluorescente.

#### **Précautions d'emploi**

- L'emploi d'une lampe à mercure de 50 watts est déconseillé.
- Les filtres de la rhodamine ne peuvent pas être utilisés.
- Les filtres triple bande sont déconseillés.

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

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

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

Nous vous recommandons de discuter de la mise au point de votre microscope avec le fabricant avant de commencer l'hybridation *in situ* en fluorescence ou de vous rapporter à la documentation correspondante.

## Résumé et explication – Estomac

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

La surexpression de la protéine HER2 et l'amplification du gène *HER2* dans le cancer gastrique ont été démontrées dans un grand nombre d'études (passées en revue à la référence (20)). Une positivité pour HER2 peut être détectée chez environ 20 % des patients par IHC ou FISH (20). Les études précliniques in vitro et in vivo ont démontré l'efficacité du trastuzumab (Herceptin™) dans divers types de cancers de l'estomac, conduisant ainsi à la mise en chantier de plusieurs études cliniques (20-24). Dans une étude de phase III BO18255, l'essai ToGA, des patients HER2 positifs atteints d'adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne localement avancé, inopérable, récidivant et/ou métastasique ont reçu de manière aléatoire du 5-FU ou de la capécitabine et de la cisplatine, seuls ou en association avec le trastuzumab. Une augmentation statistiquement significative de la survie globale (SG) a été observée chez les patients ayant reçu un traitement combiné de trastuzumab et de chimiothérapie (25). Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie avec une forte affinité à la protéine HER2 et s'est avéré inhiber la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment la protéine HER2 in vitro et in vivo (21-24).

## Principe de la procédure – Estomac

Le kit *HER2* IQFISH pharmDx contient tous les principaux réactifs nécessaires pour réaliser une procédure FISH sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Après déparaffinage et réhydratation, les échantillons sont chauffés dans une solution de prétraitement, puis soumis à une digestion protéolytique utilisant de la pepsine. Après les étapes de chauffage et de digestion protéolytique, ce kit utilise un mélange de sondes IQISH non toxique prêt à l'emploi basé sur l'association des technologies PNA (acide nucléique peptidique) (12) et ADN. Ce mélange de sondes est composé d'un mélange de sondes ADN marquées au Texas Red couvrant une région de 218 kb incluant le gène *HER2* sur le chromosome 17, et d'un mélange de sondes PNA marquées à la fluorescéine ciblant la région centromérique du chromosome 17 (CEN-17). L'hybridation spécifique sur ces deux cibles entraîne la formation d'un signal fluorescent rouge net au niveau de chaque locus du gène *HER2* et d'un signal fluorescent vert net au niveau de chaque centromère du chromosome 17. Après un lavage avec une solution stringente, les échantillons sont montés avec un milieu de montage pour la fluorescence contenant du DAPI et sont recouverts d'une lamelle de protection. À l'aide d'un microscope à fluorescence équipé de filtres appropriés (voir l'annexe 3), les cellules tumorales sont localisées et une numération des signaux rouges (*HER2*) et verts (CEN-17) est effectuée. Le rapport *HER2/CEN-17* est ensuite calculé. Les cellules normales dans la coupe de tissu analysée servent de contrôle positif interne de l'efficacité du prétraitement et de l'hybridation. Pour plus de détails, voir la section Interprétation de la coloration.

Pour une formation interactive en ligne, utiliser le programme de formation en ligne *HER2* IQFISH pharmDx conçu pour former rapidement et avec précision les techniciens de laboratoire, les pathologistes et les scientifiques aux techniques nécessaires à l'obtention de résultats optimaux avec le test *HER2* IQFISH pharmDx : [www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Réactifs – Estomac

### Matériel fourni

Le matériel répertorié ci-dessous est suffisant pour effectuer 20 tests (un test est défini comme une zone cible de 22 mm x 22 mm). Le nombre de tests est basé sur l'utilisation de 250 µL par lame du flacon 2A (5 à 8 gouttes), 10 µL par lame du flacon 3 et 15 µL par lame du flacon 5. Les solutions contenues dans les flacons 3 et 5 étant visqueuses, il peut s'avérer nécessaire de les centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse afin de recueillir tout le réactif fourni.

Le matériel contenu dans ce kit permet d'effectuer 10 cycles de coloration distincts (quatre cycles distincts en cas d'utilisation de la méthode d'immersion dans la pepsine). Le test HER2 IQFISH pharmDx est expédié avec de la carboglace. **Pour être sûr que les éléments du kit n'ont pas été exposés à des températures élevées pendant le transport, on doit trouver de la carboglace à sa réception.** Il est à noter que certains éléments du kit peuvent rester décongelés, mais cela n'affecte pas les performances du test HER2 IQFISH pharmDx.

#### Flacon 1

**PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)**

**Solution de prétraitement (20x)**

150 mL, concentrée 20x

Tampon MES (acide 2-[N-morpholino]éthanesulphonique).

#### Flacon 2A

**PEPSIN**

**Pepsine**

4 x 6,0 mL, prêt à l'emploi

Solution de pepsine, pH 2,0 ; contient un stabilisateur et un agent antimicrobien.

#### Flacon 2B

**PEPSIN DILUENT (10x)**

**Diluant de la pepsine (10x)**

24 mL, concentré 10x

Tampon de dilution, pH 2,0 ; contient un agent antimicrobien.

#### Flacon 3

**HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX**

**Mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH**

0,2 mL, prêt à l'emploi

Mélange de sondes ADN HER2 marquées au Texas Red et de sondes PNA CEN-17 marquées à la fluorescéine ; fourni dans un tampon d'hybridation IQISH.

#### Flacon 4

**STRINGENT WASH BUFFER (20x)**

**Tampon de lavage stringent (20x)**

150 mL, concentré 20x

Tampon SSC (solution saline/citrate de sodium) avec un détergent (Tween-20).

#### Flacon 5

**FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM**

**Milieu de montage pour la fluorescence**

0,4 mL, prêt à l'emploi

Milieu de montage pour la fluorescence avec 500 µg/L de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

## Flacon 6

### WASH BUFFER (20x)

**Tampon de lavage (20x)**  
500 mL, concentré 20x  
Tampon Tris/HCl.

### COVERSLIP SEALANT

**Étanchéisant pour lamelle de protection**  
1 tube, prêt à l'emploi  
Solution pour un vernissage supprimable des lamelles de protection.

**REMARQUE :** les réactifs du kit suivants, solution de prétraitemen (20x), pepsine, diluant de la pepsine (10x), tampon de lavage stringent (20x), milieu de montage pour la fluorescence, tampon de lavage (20x) et étanchéisant pour lamelle de protection, sont interchangeables avec les réactifs correspondants du kit Histology FISH Accessory Kit de Dako, réf. K5799.

## Matériel requis mais non fourni

Réactifs de laboratoire

Eau distillée ou déionisée

Éthanol à 96 %

Xylène ou substituts du xylène

## Matériel de laboratoire

Lingettes absorbantes

Pipettes réglables

Thermomètre à immersion partielle étalonné (plage de température de 37 à 100 °C)

Thermomètre de surface étalonné (plage de température de 37 à 100 °C)

Lamelles de protection (22 mm x 22 mm)

Pince

Hotte de laboratoire

Bloc chauffant ou étuve hybridation\*

Chambre d'hybridation humide\*

Microcentrifugeuse

Lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003, ou lames revêtues de poly-L-lysine (voir la section Préparation des échantillons)

Cuves ou bains de coloration

Minuteur (pouvant accepter des intervalles de 2 à 15 minutes)

Agitateur Vortex

Bain-marie avec couvercle (pouvant maintenir une température de 37 (±2) °C, 63 (±2) °C et de 95 à 99 °C)

Four à micro-ondes avec fonction de détection si le prétraitemen est réalisé à l'aide d'un four à micro-ondes (voir la section B3. Protocole de coloration. Étape 1 : Prétraitemen, Méthode B)

\* Tout appareillage permettant d'assurer des conditions identiques à celles décrites peut être utilisé pour la dénaturation et l'hybridation.

## **Microscope et accessoires**

Filtres pour microscope à fluorescence : double filtre DAPI et FITC/Texas Red ou filtres simples FITC et Texas Red - voir l'annexe 3 pour plus de détails.

Microscope à fluorescence avec une lampe à mercure de 100 watts, une source de lumière devant être utilisée. D'autres sources de lumière sont déconseillées avec ces filtres.

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

## **Précautions – Estomac**

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro.
  2. Pour utilisateurs professionnels.
  3. Le Stringent Wash Buffer (20x), porte la mention suivante : Fiche de données de sécurité disponible sur demande.
  4. La Pepsin porte les mentions suivantes :



## Danger

Contient : une masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)

H314	Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P304 + P340 + P310	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P301 + P310 + P331	EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Ne PAS faire vomir la personne.
P303 + P361 + P353 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P305 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef.
P405	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.
P501	

5. Le Pepsin Diluent (10x) porte les mentions suivantes :



## Danger

Contient : une masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)

H225 Liquide et vapeurs très inflammables.

H314	Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
H336	Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H412	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'ignition. Ne pas fumer.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P304 + P340 + P310	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P301 + P310 + P331	EN CAS D'INGESTION : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Ne PAS faire vomir la personne.
P303 + P361 + P353 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P305 + P310	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

6. Le mélange HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix porte les mentions suivantes :



#### Avertissement

Contient : dextran sulfate de sodium, carbonate d'éthylène

H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H335	Peut irriter les voies respiratoires.
H373	Peut endommager les organes suite à des expositions répétées ou prolongées.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P260	Ne pas respirer les vapeurs.
P304 + P340 + P312	EN CAS D'INHALATION : Transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

7. Le Wash Buffer (20x) porte les mentions suivantes :



## Avertissement

H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
P280	Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P264	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

8. Le Coverslip Sealant porte les mentions suivantes :



## Danger

Contient : naphta léger (pétrole), hydrotraité

H225	Liquide et vapeurs très inflammables.
H315	Provoque une irritation cutanée.
H336	Peut provoquer somnolence ou vertiges.
H411	Toxique pour les organismes aquatiques avec des effets néfastes à long terme.
P280	Porter des gants de protection. Porter un vêtement de protection. Porter un équipement de protection du visage ou des yeux.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'ignition. Ne pas fumer.
P241	Utiliser du matériel électrique, de ventilation, d'éclairage et de manipulation antidéflagrant.
P240	Mise à la terre et liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P304 + P340	EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.
P303 + P361 + P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau.
P235	Tenir au frais.
P501	Éliminer le contenu et le récipient conformément à l'ensemble des réglementations locales, régionales, nationales et internationales.

9. Les échantillons, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux qui y ont été exposés, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection, et être éliminés avec toutes les précautions d'emploi nécessaires (13). Ne jamais pipeter les réactifs à la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.

10. Minimiser tout risque de contamination microbienne des réactifs afin d'éviter des résultats erronés.
11. Toute modification des durées et des températures d'incubation spécifiées est susceptible d'entraîner des résultats erronés.
12. Toute modification des méthodes de fixation des tissus et des épaisseurs d'échantillons spécifiées peut affecter la morphologie tissulaire et/ou l'intensité du signal.
13. Éviter l'évaporation du mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* pendant l'hybridation en assurant une humidité suffisante dans la chambre d'hybridation.
14. Les réactifs sont à la dilution optimale. Une dilution supplémentaire peut entraîner une perte des performances.
15. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
16. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
17. Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur le site [www.agilent.com](http://www.agilent.com) ou sur demande.
18. En règle générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.
19. En raison de la nature hétérogène des échantillons de cancers de l'estomac, il est important de procéder à l'examen approfondi de la totalité de l'échantillon afin d'évaluer la distribution des signaux avant de sélectionner une zone particulière pour le décompte des signaux.
20. Il n'est pas recommandé d'évaluer des échantillons de très petite taille (en d'autres termes, les échantillons doivent posséder une morphologie intacte et suffisamment de noyaux pour permettre le décompte).
21. Si l'analyse FISH de *HER2* est réalisée sur un échantillon de biopsie, il faut, pour assurer une détermination fiable du statut de *HER2*, analyser plusieurs échantillons de biopsies évaluables (7 à 8) provenant de différentes régions de la tumeur.
22. Pour l'identification de tous les tissus d'un échantillon de biopsie, il est important d'inspecter la lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine.
23. Utiliser uniquement des cuves de coloration propres pour la méthode d'immersion dans la pepsine (Étape 2, Méthode C).

## Conservation – Estomac

Conserver le mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* (flacon 3) à ≤ -18 °C dans l'obscurité. Tous les autres réactifs peuvent être conservés à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Tous les réactifs tolèrent une conservation au congélateur. Les réactifs peuvent être congelés et décongelés à 10 reprises sans affecter les performances.

La pepsine, le mélange de sondes *HER2/CEN-17 IQISH* et le milieu de montage pour la fluorescence (flacons 2A, 3 et 5) peuvent s'altérer si ils sont exposés à la chaleur. Ne pas laisser ces composants à température ambiante.

Le mélange de sondes *HER2/CEN-17 IQISH* et le milieu de montage pour la fluorescence (flacons 3 et 5) peuvent s'altérer si ils sont exposés à une luminosité intense. Ne pas conserver ces éléments, ni procéder à l'analyse sous une lumière trop vive telle que la lumière du soleil.

Ne pas utiliser le kit après la date de péremption indiquée sur la boîte. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles spécifiées dans cette notice, les performances des réactifs doivent être validées par l'utilisateur (14).

Aucun signe évident n'indique l'instabilité de ce produit. Par conséquent, il est important d'évaluer les cellules normales dans la coupe de tissu analysée. Si l'on observe un profil de fluorescence inattendu qui ne peut pas être expliqué par un changement des procédures du laboratoire et que l'on soupçonne un problème avec le test *HER2 IQFISH pharmDx*, contacter l'assistance technique de Dako.

## Préparation des échantillons – Estomac

Les échantillons d'adénocarcinomes gastriques, y compris de la jonction gastro-œsophagienne, provenant de biopsies, d'excisions ou de résections doivent être manipulés de manière à préserver le tissu pour l'analyse FISH. Des méthodes standard de traitement des tissus pour la coloration immunocytochimique doivent être utilisées pour tous les échantillons (15). Lors du test d'échantillons de biopsies de petite taille, s'assurer de disposer de la morphologie tumorale intacte et de la présence de suffisamment de noyaux pour la numération des signaux. Si l'analyse *HER2 FISH* est réalisée sur un échantillon de biopsie, il faut, pour assurer une détermination fiable du statut de *HER2*, analyser plusieurs échantillons de biopsies évaluables (7 à 8) provenant de différentes régions de la tumeur.

### Coupes incluses en paraffine

Seuls les tissus préservés dans du formol neutre tamponné et inclus en paraffine conviennent à cet usage. Les échantillons doivent, par exemple, être inclus dans des blocs d'une épaisseur de 3 à 4 mm et être fixés pendant 18 à 24 heures dans du formol neutre tamponné. Les échantillons de biopsies ont été fixés pendant 6 à 8 heures lors de l'étude ToGA (pour des détails sur l'étude, se reporter à la référence (25)). Les tissus sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées et dans du xylène, pour être ensuite infiltrés avec de la paraffine liquide maintenue à une température ne dépassant pas 60 °C. Les tissus, fixés et inclus correctement, se conservent indéfiniment avant la coupe et le montage sur lame si'ils sont conservés dans un endroit frais (15 à 25 °C) (15, 16). D'autres fixateurs ne conviennent pas.

L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être comprise entre 3 et 6 µm.

Les lames nécessaires pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2* et la vérification de la présence d'une tumeur doivent être préparées au même moment. Un minimum de 2 coupes consécutives est recommandé, 1 coupe pour détecter la présence d'une tumeur colorée à l'hématoxyline et l'éosine (coloration H&E), et 1 coupe pour l'analyse de l'amplification du gène *HER2*. Il est recommandé de monter les coupes de tissus sur des lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003, ou des lames revêtues de poly-L-lysine. Les échantillons doivent être analysés dans les 4 à 6 mois suivant la coupe lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (20 à 25 °C).

## **INSTRUCTIONS D'UTILISATION – Estomac**

### **A. Préparation des réactifs – Estomac**

Il est pratique de préparer les réactifs suivants avant de procéder à la coloration :

#### **A.1 Solution de prétraitement**

Des cristaux peuvent se former dans le flacon 1, mais ils se dissolvent à température ambiante. Vérifier l'absence de cristaux avant de préparer le réactif.

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 1 (solution de prétraitement 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. La solution diluée inutilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter la solution diluée si elle a un aspect trouble.

#### **A.2 Tampon de lavage stringent**

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 4 (tampon de lavage stringent 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué inutilisé peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter le tampon dilué s'il a un aspect trouble.

#### **A.3 Tampon de lavage**

Préparer une quantité suffisante à partir du flacon 6 (tampon de lavage 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée ou déionisée. Le tampon dilué inutilisé peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois. Jeter le tampon dilué s'il a un aspect trouble.

#### **A.4 Série de bains d'éthanol**

À partir d'une solution d'éthanol à 96 %, préparer 3 cuves contenant de l'éthanol à 70 %, à 85 % et à 96 % respectivement. Conserver les cuves couvertes à température ambiante ou entre 2 et 8 °C, et les utiliser pour un maximum de 200 lames. Jeter les solutions si elles ont un aspect trouble.

#### **A.5 Solution de pepsine**

Une solution de pepsine n'est nécessaire qu'en cas d'utilisation de la méthode d'immersion dans la pepsine (méthode C).

Préparer la solution de pepsine comme suit :

Pour un récipient pouvant contenir six lames, préparer 60 mL de solution de pepsine :

Ajouter 48 mL d'eau distillée ou déionisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans le récipient.

Ajouter 6 mL de diluant de la pepsine (10x) froid (2 à 8 °C) (flacon 2B) dans le récipient.

Ajouter 6 mL de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) dans le récipient.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 (±2) °C dans un bain-marie.

Pour un récipient pouvant contenir 24 lames et 240 mL de solution de pepsine :

Ajouter 192 mL d'eau distillée ou déionisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans le récipient.

Ajouter 24 mL de diluant de la pepsine (10x) froid (2 à 8 °C) (flacon 2B) dans le récipient.

Ajouter 24 mL de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) dans le récipient.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 (±2) °C dans un bain-marie.

La solution de pepsine ramenée à la bonne température doit être utilisée dans les 5 heures.

## **B. Procédure de coloration – Estomac**

### **B.1 Remarques sur la procédure**

L'utilisateur doit lire attentivement les présentes instructions et se familiariser avec tous les composants avant utilisation (voir la section Précautions).

Tous les réactifs doivent être ramenés à la bonne température comme suit avant d'être utilisés :

**Flacon 1 :** la Pre-Treatment Solution diluée doit être équilibrée entre **95 et 99 °C** si un bain-marie est utilisé pour le prétraitement (section B3. Protocole de coloration, Étape 1 : prétraitement, méthode A). Si un four à micro-ondes avec fonction de détection est utilisé pour le prétraitement (B3. Protocole de coloration, Étape 1 : prétraitement, méthode B) la Pre-Treatment Solution diluée doit être équilibrée à température ambiante entre 20 et 25 °C.

**Flacon 2A :** la pepsine doit être appliquée entre **2 et 8 °C** (section B3, Protocole de coloration, Étape 2, Méthodes A et B) et elle doit rester constamment froide.

**Flacon 2B :** le diluant de la pepsine (10x) doit être appliqué entre **2 et 8 °C** (section B3, Protocole de coloration, Étape 2, Méthode C).

**Flacon 3 :** le mélange *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* se sépare en deux phases lorsqu'il est conservé à  $\leq -18$  °C. Avant d'utiliser le flacon 3, s'assurer que le tampon ne présente qu'une seule phase en équilibrant le mélange de sondes à température ambiante (**20-25 °C**) puis en le mélangeant. Décongeler le flacon 3 à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes maximum (à l'abri de toute lumière vive), puis agiter vigoureusement le flacon pendant 15 secondes à 2 500 tr/min en utilisant un mélangeur Vortex. Stocker le flacon 3 à  $\leq -18$  °C immédiatement après utilisation.

**Flacon 4 :** tampon de lavage stringent dilué ; une cuve doit être ramenée à température ambiante et une autre à une température de **63 (±2) °C** avant utilisation.

**Flacon 5 :** le milieu de montage pour la fluorescence peut être appliqué à n'importe quelle température comprise entre **2 et 25 °C**.

**Flacon 6 :** le tampon de lavage dilué doit être ramené à température ambiante (**20 à 25 °C**).

**L'étanchéisant pour lamelle de protection** peut être appliqué à n'importe quelle température comprise entre **2 et 25 °C**.

### Toutes les étapes doivent être réalisées à la température indiquée.

La procédure comprend plusieurs déshydratations suivies d'un séchage des coupes de tissus. S'assurer que les coupes de tissus sont complètement sèches avant de passer à l'étape suivante. Ne pas laisser les coupes de tissus se dessécher pendant les autres étapes de la procédure.

Si la procédure de coloration doit être interrompue, les lames peuvent être conservées dans le tampon de lavage après l'étape de déparaffinage pendant une (1) heure maximum à température ambiante (20 à 25 °C) sans que cela n'affecte les résultats.

### B.2 Traitement des tissus avant la coloration

**Déparaffinage et réhydratation :** avant de réaliser l'analyse, les lames de tissus doivent être déparaffinées afin d'éliminer le milieu d'inclusion, puis réhydratées. Éviter toute élimination incomplète de la paraffine. Tout résidu de milieu d'inclusion provoque une augmentation de la coloration non spécifique. Cette étape doit être réalisée à température ambiante (20-25 °C).

1. Placer les lames dans un bain de xylène et laisser incuber pendant 5 minutes ( $\pm 1$  minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.
2. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans de l'éthanol à 96 % pendant 2 minutes ( $\pm 1$  minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.
3. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans de l'éthanol à 70 % pendant 2 minutes ( $\pm 1$  minute). Renouveler les bains et répéter l'opération une fois.
4. Éliminer l'excès de liquide en tapotant et placer les lames dans le tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant au moins 2 minutes. Commencer la procédure de coloration comme indiqué dans la section B.3, Étape 1, Prétraitement.

Les solutions de xylène et d'alcool doivent être renouvelées au maximum toutes les 200 lames.

Des substituts du xylène peuvent être utilisés.

**REMARQUE :** les réactifs et les instructions fournis dans ce kit ont été conçus pour des performances optimales. Une dilution supplémentaire des réactifs ou une modification des températures d'incubation peuvent entraîner des résultats erronés ou discordants. Toute différence dans le traitement des tissus ou dans les procédures techniques dans le laboratoire de l'utilisateur peut invalider les résultats du test.

## B.3 Protocole de coloration

### Étape 1 : prétraitement

Le prétraitement peut être réalisé soit en utilisant un bain-marie, comme décrit dans la méthode A), soit en utilisant un four à micro-ondes avec fonction de détection, comme décrit dans la méthode B).

#### Méthode A : prétraitement en utilisant un bain-marie

Remplir les cuves de coloration, par ex. cuves de Coplin, de solution de prétraitement diluée (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.1). Placer les cuves de coloration contenant la solution de prétraitement diluée dans un bain-marie. Chauffer le bain-marie et la solution de prétraitement entre 95 et 99 °C. Vérifier la température à l'intérieur de la cuve à l'aide d'un thermomètre étalonné pour s'assurer que la température est correcte. Recouvrir les cuves avec des couvercles afin de stabiliser la température et d'éviter toute évaporation.

Immerger les coupes déparaffinées se trouvant à température ambiante dans les cuves de coloration contenant la solution de prétraitement préchauffée. Vérifier à nouveau la température et laisser incuber pendant 10 minutes ( $\pm 1$  minute) entre 95 et 99 °C.

Retirer la cuve contenant les lames du bain-marie. Retirer le couvercle et laisser les lames refroidir dans la solution de prétraitement pendant 15 minutes à température ambiante.

Transférer les lames dans une cuve contenant du tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

**REMARQUE :** la solution de prétraitement est conçue pour une seule application. Ne pas la réutiliser.

#### Méthode B : prétraitement en utilisant un four à micro-ondes avec fonction de détection

Remplir une cuve en plastique de solution de prétraitement diluée à température ambiante (20 à 25 °C). Immerger les coupes déparaffinées dans la solution de prétraitement, recouvrir la cuve d'un couvercle percé et la placer dans le four à micro-ondes. Sélectionner la fonction de détection de l'ébullition ainsi qu'un programme qui s'exécute pendant 10 minutes après avoir atteint la température d'ébullition\*.

Après les 10 minutes d'incubation, sortir la cuve contenant les lames du four. Retirer le couvercle et laisser refroidir pendant 15 minutes à température ambiante. Transférer les lames dans une cuve contenant du tampon de lavage dilué et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C). Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

\* L'utilisation d'un four à micro-ondes avec fonction de détection signifie que le four doit être doté d'un capteur et de programmes qui chauffent d'abord la solution de prétraitement jusqu'à son point d'ébullition puis maintiennent la température de prétraitement requise (supérieure à 95 °C) tout en décomptant le temps préréglé (10 minutes ( $\pm 1$  minute)). Il est possible que certains modèles de fours à micro-ondes avec fonction de détection ne permettent pas de choisir le temps de chauffage. Si le modèle comprend uniquement des programmes préréglés, s'assurer de sélectionner un programme qui maintient la température de prétraitement requise (supérieure à 95 °C) pendant au moins 10 minutes ( $\pm 1$  minute) et arrêter manuellement le programme après 10 minutes ( $\pm 1$  minute).

**REMARQUE :** la solution de prétraitement est conçue pour une seule application. Ne pas la réutiliser.

### Étape 2 : pepsine, prête à l'emploi ou solution de pepsine

L'incubation de la pepsine peut être réalisée en déposant directement sur les lames des gouttes de pepsine prête à l'emploi, soit à température ambiante (20 à 25 °C) (Méthode A), soit à 37 °C (Méthode B). La seconde option consiste à immerger les lames dans une solution de pepsine et à les laisser incuber à 37 ( $\pm 2$ ) °C (Méthode C).

## Méthode A et méthode B :

Éliminer l'excès de tampon en tapotant. À l'aide d'un tissu non pelucheux (ex. : lingette absorbante ou tampon de gaze), essuyer soigneusement le pourtour de l'échantillon pour enlever tout liquide restant et pour garder les réactifs à l'intérieur de la zone prescrite.

Déposer 5 à 8 gouttes (250 µL) de pepsine froide (2 à 8 °C) (flacon 2A) pour recouvrir l'échantillon. La pepsine doit toujours être conservée entre 2 et 8 °C.

## Méthode A : pepsine prête à l'emploi - incubation entre 20 et 25 °C

Laisser incuber à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 5 à 15 minutes. Une durée d'incubation de 5 à 15 minutes convient à la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation du tissu et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et elle doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.3) pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25°C).

Remplacer le tampon de lavage dilué et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

## Méthode B : pepsine prête à l'emploi - incubation à 37 °C

Placer l'échantillon avec la pepsine sur un bloc chauffant à 37 °C et incuber pendant 3 à 5 minutes. Une durée d'incubation de 3 à 5 minutes convient pour la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation des tissus et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser les coupes de tissus sécher complètement à l'air libre.

## Méthode C : solution de pepsine - immersion des lames dans une solution de pepsine à 37 °C

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer quatre cycles distincts (60 mL de solution de pepsine, petit récipient pour six lames) ou un seul cycle (240 mL de solution de pepsine, grand récipient pour 24 lames). Préparer la solution de pepsine comme indiqué à la section A.5.

Poser le couvercle sur le récipient et ramener la solution de pepsine à 37 (±2) °C dans un bain-marie. S'assurer que la température s'est stabilisée. Mesurer la température à l'intérieur du récipient à l'aide d'un thermomètre étalonné afin de s'assurer que la température est correcte.

Éliminer l'excès de tampon de lavage en tapotant. Immerger les lames dans la solution de pepsine à 37 (±2) °C et laisser incuber pendant 20 à 30 minutes. Une durée d'incubation de 20 à 30 minutes convient à la plupart des échantillons, mais la durée d'incubation optimale peut dépendre de la fixation du tissu et/ou de l'épaisseur de l'échantillon et elle doit être déterminée par l'utilisateur.

Éliminer l'excès de solution de pepsine en tapotant et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Remplacer le tampon de lavage et laisser tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires. Procéder à la déshydratation.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser les coupes de tissus sécher complètement à l'air libre.

### Étape 3 : mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH

Le mélange HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix se sépare en deux phases lorsqu'il est conservé à ≤ -18 °C. Avant d'utiliser le flacon 3, s'assurer que le tampon ne présente qu'une seule phase en équilibrant le mélange de sondes à température ambiante (**20 à 25 °C**) puis en le mélangeant. Décongeler le flacon 3 à température ambiante (20-25 °C) pendant 30 minutes maximum (à l'abri de toute lumière vive), puis agiter vigoureusement le flacon pendant 15 secondes à 2 500 tr/min en utilisant un mélangeur Vortex. Stocker le flacon 3 à ≤ -18 °C immédiatement après utilisation.

Appliquer 10 µL de mélange HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix (flacon 3) au centre de la coupe de tissu. Placer immédiatement une lamelle de protection de 22 mm x 22 mm sur le mélange de sondes et le laisser s'étaler régulièrement sous la lame. Éviter la formation de bulles d'air. En cas de formation de bulles d'air, les éliminer du tissu en tapotant doucement à l'aide de pinces.

**Ne pas oublier de stocker le flacon 3 à ≤ -18 °C immédiatement après utilisation.**

Sceller la lamelle de protection avec du Coverslip Sealant en éjectant l'étanchéisant sur le pourtour de la lame. Laisser le Coverslip Sealant dépasser de la lamelle de protection et de la lame pour former un joint autour de la lamelle. S'assurer que le Coverslip Sealant recouvre bien tout le bord de la lamelle de protection.

Placer les lames sur une surface métallique ou en pierre plate (bloc chauffant ou bloc dans un four d'hybridation) préchauffée à 66 (±1) °C. Dénaturer pendant exactement 10 minutes.

Placer les lames dans une chambre d'hybridation humide préchauffée. Couvrir la chambre d'un couvercle et incuber à 45 (±2) °C pendant 60 à 120 minutes\*. Noter qu'une température d'hybridation de 37 °C ne convient pas aux sondes contenues dans ce kit.

\* Tout appareillage permettant d'assurer des conditions identiques à celles décrites ci-dessus peut être utilisé pour la dénaturation et l'hybridation.

### Étape 4 : lavage stringent

Remplir deux cuves de coloration, par ex. cuves de Coplin, de tampon de lavage stringent dilué (voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section A.2). Un volume minimum de 100 mL ou 15 mL par lame dans chaque cuve est recommandé.

Placer l'une des cuves de coloration contenant le tampon de lavage stringent dilué à température ambiante dans une hotte de laboratoire et l'autre dans un bain-marie. Chauffer le bain-marie et le tampon de lavage stringent dilué à 63 (±2) °C. S'assurer que la température s'est stabilisée. Recouvrir la cuve avec un couvercle pour stabiliser la température et éviter toute évaporation. Mesurer la température à l'intérieur de la cuve se trouvant au bain-marie à l'aide d'un thermomètre étalonné afin de s'assurer que la température est correcte. Le tampon de lavage stringent contient un détergent et peut se troubler à 63 °C ; ceci n'affecte pas les performances.

À l'aide d'une pince ou de gants, sortir les lames de la chambre d'hybridation et retirer avec précaution l'étanchéisant ainsi que les lamelles de protection, puis placer les lames les unes après les autres dans la cuve de prélavage ramenée à température ambiante.

Une fois toutes les lamelles de protection retirées, transférer les lames de la cuve de prélavage à température ambiante dans la cuve à 63 (±2) °C se trouvant dans le bain-marie.

Immédiatement après avoir transféré les lames dans la cuve à 63 (±2) °C se trouvant dans le bain-marie, faire démarrer le minuteur. Effectuer un lavage stringent pendant exactement 10 minutes.

Retirer les lames du tampon de lavage stringent dilué et faire tremper les coupes dans le tampon de lavage dilué pendant 3 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

Renouveler le tampon de lavage dilué et faire tremper les coupes pendant 3 minutes supplémentaires.

Déshydrater les coupes de tissus dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 2 minutes dans de l'éthanol à 70 %, 2 minutes dans de l'éthanol à 85 % et 2 minutes dans de l'éthanol à 96 %.

Laisser sécher complètement les coupes de tissus.

### Étape 5 : montage

Déposer 15 µL de milieu de montage pour la fluorescence contenant du DAPI (flacon 5) sur la zone cible de la lame et poser une lamelle de protection en verre.

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

### Contrôle de qualité – Estomac

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

## Interprétation de la coloration – Estomac

### Tissus pouvant être évalués

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

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

#### 1) Répartition homogène des signaux

En cas de répartition homogène des signaux, compter le nombre de centromères chromosomiques (signaux verts) et le nombre de gènes HER2 (signaux rouges) dans 20 cellules d'une (1) ou de deux (2) zones représentatives de la tumeur.

#### 2) Répartition hétérogène des signaux

En cas de répartition hétérogène des signaux, compter un total de 20 cellules à partir des zones sélectionnées comme indiqué ci-dessous :

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

Si possible, ne pas sélectionner de zones se chevauchant.

### Ignorer la coloration de l'ADN bactérien

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

### Numération des signaux

Lorsqu'une zone a été sélectionnée pour l'évaluation des signaux, commencer l'analyse dans l'un des 20 noyaux voisins choisis, puis effectuer le décompte cellule par cellule, en n'ignorant que les noyaux ne répondant pas aux critères de qualité. Compter le nombre de signaux dans la limite nucléaire de chaque noyau évalué, conformément aux recommandations ci-dessous (voir également l'annexe 7).

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

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

### Guide de décompte des signaux

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

Noter le décompte des signaux dans un tableau comme celui donné dans les annexes 5 et 6.

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

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

Les échantillons ayant un rapport *HER2/CEN-17* supérieur ou égal à 2 doivent être considérés comme présentant une amplification du gène *HER2* (26).

Les résultats se trouvant à la valeur seuil ou proches de la valeur seuil (1,8 à 2,2) doivent être interprétés avec prudence.

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

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

**Limitations – Estomac**

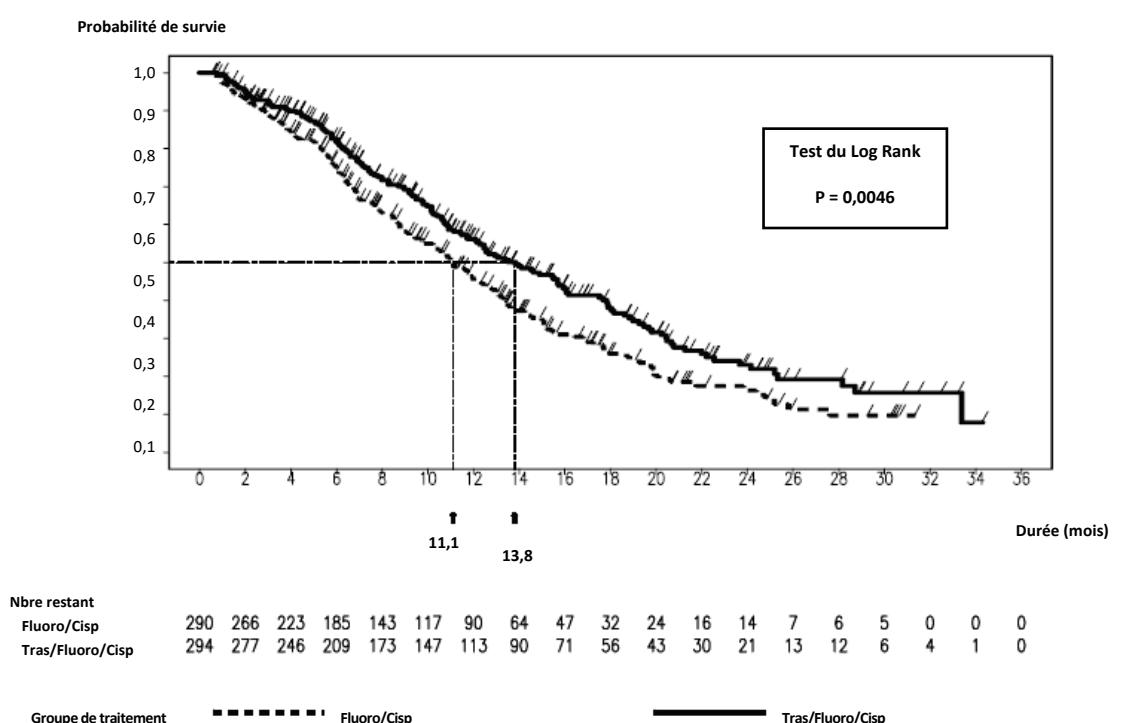
1. L'analyse FISH est un procédé en plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée pour la sélection des réactifs appropriés, la sélection des tissus, la fixation et le traitement, la préparation des lames FISH et l'interprétation des résultats de la coloration.
2. Les résultats de l'analyse FISH dépendent de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Les fixation, lavage, séchage, chauffage ou coupe incorrects, ou bien une contamination par d'autres tissus ou liquides peuvent avoir une influence sur l'hybridation de la ou des sonde(s). Des résultats non cohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion ou à des irrégularités inhérentes au tissu.
3. Pour des résultats optimaux et reproductibles, les lames de tissus doivent être entièrement déparaffinées. L'élimination de la paraffine doit être terminée avant le début du processus de coloration. (Voir INSTRUCTIONS D'UTILISATION, section B.2).
4. Utiliser uniquement un bain-marie, un bloc chauffant et une étuve à hybridation à température étalonnée. L'utilisation d'autres types de matériel peut entraîner l'évaporation du mélange de sondes *HER2/CEN-17* IQISH au cours de l'hybridation et celle-ci doit être validée par l'utilisateur.

## Caractéristiques de performance – Estomac

### Contexte :

L'innocuité et l'efficacité du trastuzumab (Herceptin™) ont été démontrées dans une étude clinique (l'essai ToGA) (25). L'étude a été conçue comme une étude multicentrique de phase III, randomisée et ouverte, incluant des patients HER2 positifs atteints d'adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne localement avancé, inopérable, récidivant et/ou métastasique. Dans l'essai ToGA, la positivité à HER2 a été définie comme déterminée par IHC (3+) (HercepTest™, Dako) et/ou par HER2 FISH ( $HER2/CEN-17 \geq 2,0$ ) (HER2 FISH pharmDx Kit, Dako (réf. K5331)). Après leur enrôlement dans l'étude, les patients ont reçu de manière aléatoire une chimiothérapie (5-FU ou capécitabine et cisplatine) ou une chimiothérapie plus du trastuzumab. Le critère de jugement principal de l'étude était la survie globale (SG).

Dans l'étude, 594 patients au total ont été sélectionnés de manière aléatoire et 584 patients ont reçu le médicament objet de l'étude et ont été inclus dans l'échantillon complet d'analyse. Concernant le critère de jugement principal, la combinaison chimiothérapie + trastuzumab s'est avérée statistiquement supérieure à la chimiothérapie seule. La survie globale médiane est passée de 11,1 à 13,8 mois ( $p=0,0046$ ) avec un taux de risque de 0,74 (IC à 95 % : 0,60 à 0,91). Les courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale sont présentées à la figure 3.



**Figure 3.** Courbe de Kaplan-Meier de la survie globale (n=584).

Des analyses exploratoires pré-spécifiées de sous-groupes définis selon le statut de HER2 ont été réalisées une fois les données disponibles. Deux nouveaux sous-groupes HER2 ont par ailleurs été définis post hoc selon l'évaluation IHC :

**Groupe 1 (« groupe exprimant faiblement HER2 ») :**

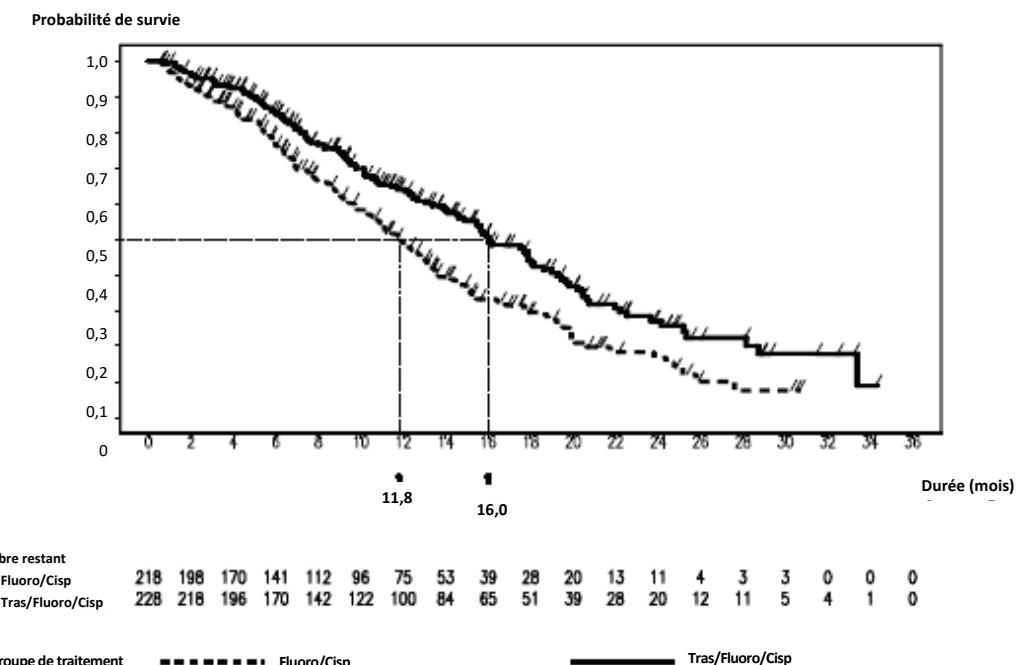
IHC 0/FISH+ et IHC 1+/FISH+ (n=131)

**Groupe 2 (« groupe exprimant fortement HER2 ») :**

IHC 2+/FISH+ et IHC 3+ (FISH+ ou FISH- ou FISH sans résultat) (n=446)

Lorsque l'analyse primaire de la survie globale a été répétée post hoc pour le « groupe exprimant fortement HER2 » (n=446), l'avantage du traitement combiné était encore supérieur. La survie globale médiane du groupe de patients ayant reçu une chimiothérapie plus du trastuzumab

atteignait 16,0 mois contre 11,8 pour les patients sous chimiothérapie seule. Le taux de risque de cette analyse a baissé jusqu'à 0,65 (IC à 95 % : 0,51 à 0,83). Les courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale du « groupe exprimant fortement expression HER2 » sont présentées à la figure 4.



**Figure 4.** Courbe de Kaplan-Meier pour la survie globale du « groupe exprimant fortement HER2 » (n=446).

L'étude BO18255 a mis en évidence l'utilité clinique du test HercepTest™ et du kit HER2 FISH pharmDx dans le cadre de l'évaluation du statut de HER2 chez les patients atteints d'adénocarcinome de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne localement avancé, inopérable, récidivant et/ou métastasique,

### Sensibilité analytique

**Sensibilité analytique**  
La sensibilité analytique du mélange de sondes *HER2/CEN-17* IQISH a été vérifiée en utilisant 18 échantillons d'adénocarcinome gastrique. Le rapport entre le nombre de signaux *HER2* et de signaux *CEN-17* a été calculé sur la base du décompte de 20 noyaux de cellules saines entourant la tumeur. Le rapport *HER2/CEN-17* pour les 18 échantillons d'adénocarcinome gastrique se situait entre 0,95 et 1,06.

## **Spécificité analytique**

Les extrémités des sondes ADN *HER2* du mélange de sondes *HER2/CEN-17* ont été séquencées et les sondes cartographiées afin de confirmer qu'elles couvrent 218 kb au total, y compris le gène *HER2*.

Les sondes PNA CEN-17 du mélange de sondes *HER2/CEN-17* IQISH ont été testées individuellement et en combinaison, afin de confirmer leur hybridation spécifique à la région centromérique du chromosome 17.

Pour mesurer la capacité du test à n'identifier que les substances ciblées *HER2* et CEN-17 sans aucune interférence de la part d'autres substances, des études ont été réalisées sur des échantillons d'adénocarcinome gastrique en utilisant le flacon 3 contenant le tampon d'hybridation mais sans le mélange de sondes. Un total de 18 échantillons a été évalué pour vérifier la présence de signaux qui ne sont pas liés au mélange de sondes. Aucune détection d'autres chromosomes ciblés ni aucune interférence avec des substances étroitement liées n'ont été observées dans aucun des 18 échantillons.

### Études de robustesse

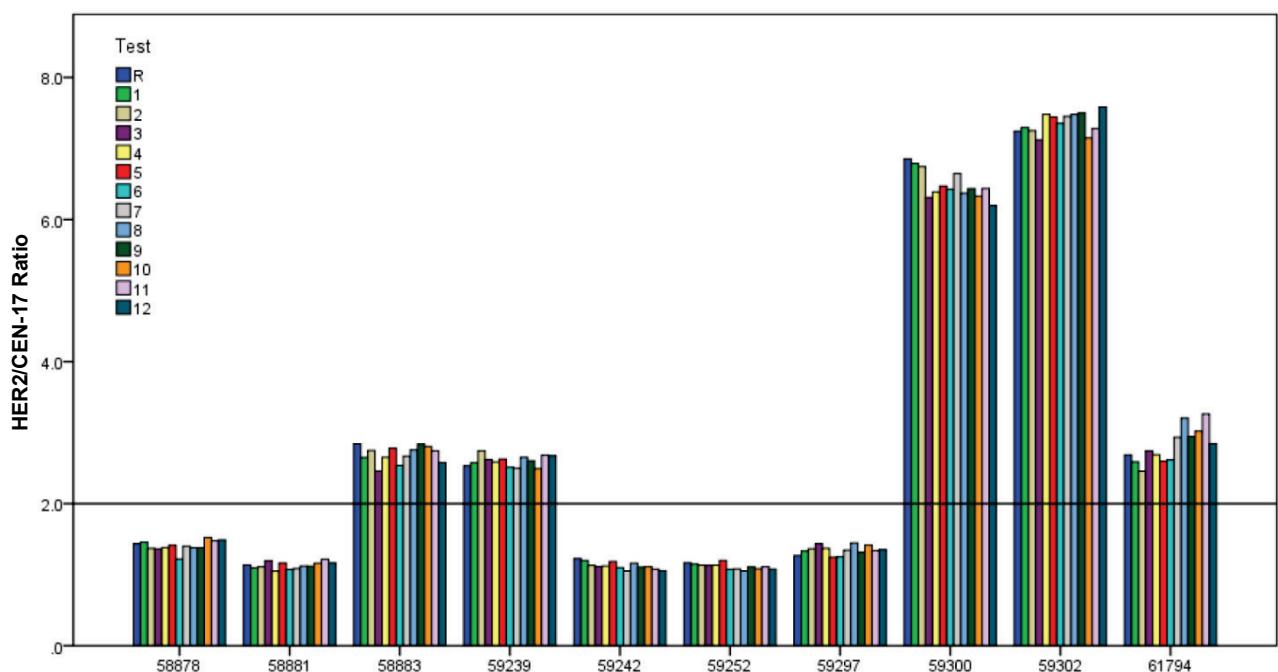
La robustesse du test *HER2* IQFISH pharmDx a été testée en variant la durée du prétraitement, la température et les méthodes de chauffage du tampon de prétraitement (four à micro-ondes ou bain-marie), la durée et la méthode d'incubation dans la pepsine (pepsine prête à l'emploi ou immersion), la température et la durée de dénaturation, la durée d'hybridation et la durée et la température du lavage stringent.

Aucune différence significative n'a été observée au niveau des résultats dans les conditions expérimentales suivantes :

- Prétraitement Méthode A) Bain-marie pendant 10 minutes combiné à des températures de 95 °C, 95 à 99 °C et 99 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes de 95 à 99 °C.
- Prétraitement Méthode B) Four à micro-ondes pendant 9, 10 et 11 minutes à >95 °C.
- Digestion par la pepsine Méthode A) avec des durées d'incubation de 5, 10 et 15 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).
- Digestion par la pepsine Méthode B) avec des durées d'incubation de 3, 4 et 5 minutes à 37 °C.
- Digestion par la pepsine Méthode C) avec des durées d'incubation de 20, 25 et 30 minutes combinée à des températures de 35, 37 et 39 °C.
- Dénaturation pendant 10 minutes combinée à des températures de 65, 66 et 67 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes à 66 °C.
- Durées d'hybridation de 60, 90 et 120 minutes à 45 °C.
- Lavage stringent pendant 10 minutes combiné à des températures de 61, 63 et 65 °C avec des durées de 9, 10 et 11 minutes à 63 °C.

**Remarque :** pour les tests de robustesse, seul un paramètre de la procédure de coloration a été modifié à la fois tandis que les autres paramètres ont été conservés. Il est recommandé de respecter les durées et les températures indiquées dans la procédure de coloration.

La procédure de coloration pour le test *HER2* IQFISH pharmDx présente des variables de protocole au niveau du chauffage de la solution de prétraitement, de la digestion par la pepsine et de la durée d'hybridation. Chaque combinaison possible et unique a été validée pour ce qui concerne le statut du gène *HER2*. La validation a été effectuée sur 10 échantillons d'adénocarcinome de l'estomac humain et de la jonction gastro-œsophagienne fixés au formol et inclus en paraffine pour chacune des 12 combinaisons possibles. Le kit *HER2* FISH pharmDx (réf. K5331) a été pris pour référence. Le rapport *HER2/CEN-17* pour chaque échantillon individuel est indiqué à la figure 5. Des tabulations croisées entre les 12 tests et la coloration de référence ont montré une concordance globale au niveau du statut du gène *HER2* de 100 % (10/10), avec un intervalle de confiance bilatéral à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 78,3 % et 100 % respectivement. La valeur Kappa était de 1,00 et le test de McNemars a montré une absence de biais (valeur p bilatérale de 1,00).



**Figure 5.** Rapports HER2/CEN-17 individuels pour 10 échantillons d'adénocarcinome gastrique humain colorés en utilisant les 12 variations de combinaison de protocole possibles avec le kit HER2 IQFISH pharmDx (réf. K5731) (tests 1 à 12) et le kit de référence HER2 FISH pharmDx (réf. K5331) (R). La ligne horizontale illustre la valeur seuil de 2,0.

### Répétabilité

La répétabilité du rapport *HER2/CEN-17* a été étudiée en utilisant le test *HER2 IQFISH pharmDx* à l'aide de coupes consécutives de neuf échantillons d'adénocarcinome gastrique distincts ayant un statut du gène *HER2* amplifié ou non amplifié. Des coupes de chaque échantillon en triple exemplaire ont été testées au cours du même cycle. Le coefficient de variation moyen était de 3,5 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 1 % à 5 %) et de 2,8 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 1 % à 5 %).

La répétabilité sur des coupes consécutives d'échantillons d'adénocarcinome gastrique de différentes épaisseurs (2, 3, 4, 5, 6 et 7 µm) a été testée avec le test *HER2 IQFISH pharmDx*. Le coefficient de variation moyen du rapport *HER2/CEN-17* était de 4,5 % (plage allant de 3 % à 6 %), à savoir dans la même plage que pour un tissu d'épaisseur égale et rentrant dans les critères d'admission prédéfinis.

### Reproductibilité

La reproductibilité inter-lots et inter-observateurs du test *HER2 IQFISH pharmDx* a été testée en utilisant trois lots de *HER2 IQFISH pharmDx* et trois observateurs. La reproductibilité a été testée sur neuf échantillons d'adénocarcinome gastrique distincts ayant un statut du gène *HER2* non amplifié ou amplifié.

Le coefficient de variation moyen pour la reproductibilité inter-lots était de 3,8 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 2 % à 7 %) et de 1,8 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 1 % à 3 %).

Le coefficient de variation moyen pour la reproductibilité inter-observateurs était de 4,3 % pour les échantillons non amplifiés (plage allant de 3 % à 5 %) et de 4,4 % pour les échantillons amplifiés (plage allant de 2 % à 7 %). Les échantillons d'adénocarcinome gastrique se composaient à 78,8 % d'échantillons de résection et à 22,2 % d'échantillons de biopsie. 55,6 % des échantillons ont été prélevés de l'estomac et 44,4 % de la jonction gastro-œsophagienne.

### Utilité clinique

L'utilité clinique du test *HER2 IQFISH pharmDx* de Dako (réf. K5731) a été étudiée lors d'une étude comparative avec le kit *HER2 FISH pharmDx* de Dako (réf. K5331). L'étude incluait 79 échantillons de cancer gastrique composés de différents types de tissus d'adénocarcinomes

gastriques, à savoir adénocarcinomes de l'estomac ou de la jonction gastro-œsophagienne et résections ou biopsies avec une répartition homogène ou hétérogène des signaux (focalisée ou en mosaïque). Le statut de l'expression de la protéine HER2 a été évalué pour toutes les tumeurs en utilisant le test Dako HercepTest™ (réf. K5207). Des échantillons de chacun des quatre groupes d'évaluation IHC (0, 1+, 2+, 3+) ont été inclus dans l'étude. La tabulation croisée du statut de HER2 obtenue par les deux tests a produit une concordance globale de 98,7 % avec un intervalle de confiance à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 94,2 % et 99,9 %. La valeur Kappa était de 0,97 avec un intervalle de confiance à 95 % affichant des limites supérieure et inférieure à 0,92 et 1,00. La valeur p du test de McNemars était de 1,00, indiquant une absence de biais entre les deux tests.

## Dépannage – Estomac

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
1. Aucun signal ou signaux de faible intensité	<p>1a. Le kit a été exposé à des températures élevées pendant le transport ou la conservation</p> <p>1b. Le microscope ne fonctionne pas correctement - Mauvais jeu de filtres - Lampe inadaptée - Lampe à mercure trop vieille - Lentilles du collecteur sales et/ou fissurées - Huile à immersion inadaptée</p> <p>1c. Signaux atténusés</p> <p>1d. Mauvaises conditions de prétraitement</p> <p>1e. Évaporation du mélange de sondes pendant l'hybridation</p>	<p>1a. Vérifier les conditions de conservation. S'assurer qu'il y avait de la carboglace à la réception des colis. S'assurer que le flacon 3 a été conservé à l'abri de la lumière, à ≤ -18 °C. S'assurer que les flacons 2A et 5 ont été conservés à l'abri de la lumière, entre 2 et 8 °C maximum.</p> <p>1b. Vérifier le microscope et s'assurer que les filtres utilisés sont adaptés aux fluorochromes du kit, que la lampe à mercure est adaptée et qu'elle n'a pas été utilisée au-delà de sa durée de vie prévue. (Voir l'annexe 7). En cas de doute, contacter le distributeur local du microscope.</p> <p>1c. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition aux sources de lumière intense.</p> <p>1d. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.</p> <p>1e. Assurer une humidité suffisante dans la chambre d'hybridation.</p>
2. Aucun signal vert	2a. Mauvaises conditions de lavage stringent	S'assurer que la température et la durée recommandées pour le lavage stringent sont bien respectées et que les lamelles de protection sont retirées avant le lavage stringent.
3. Aucun signal rouge	3a. Mauvaises conditions de prétraitement	S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.
4. Zones sans aucun signal	4a. Volume de sondes insuffisant	Veiller à ce que le volume de sondes soit suffisant pour recouvrir la zone sous la lamelle de protection.

## Cancer du estomac

Problème	Cause probable	Mesure suggérée
	4b. Formation de bulles d'air pendant l'application du mélange de sondes ou pendant le montage	4b. Éviter la formation de bulles d'air. Si des bulles sont observées, les éliminer en tapotant doucement à l'aide d'une pince.
5. Coloration de fond excessive	5a. Mauvaise fixation du tissu  5b. Élimination incomplète de la paraffine  5c. Température du lavage stringent trop basse  5d. Exposition prolongée de la coupe hybridée à une lumière intense	5a. S'assurer que seules des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine sont utilisées.  5b. Suivre les procédures de déparaffinage et de réhydratation décrites dans la section B.2.  5c. S'assurer que la température du lavage stringent est de 63 ( $\pm 2$ ) °C.  5d. Éviter les examens au microscope prolongés et minimiser l'exposition à la lumière intense.
6. Mauvaise morphologie tissulaire	6a. Mauvais traitement à la pepsine  6b. De mauvaises conditions de prétraitement peuvent provoquer un aspect trouble ou laiteux  6c. Un traitement à la pepsine trop long ou des coupes très fines peuvent faire apparaître des cellules fantômes ou convexes	6a. Respecter les durées d'incubation recommandées pour la pepsine. Voir la section B.2, étape 2.  S'assurer que la pepsine est manipulée à la bonne température. Voir la section B.1.  6b. S'assurer que la température et la durée recommandées pour le prétraitement sont bien respectées.  6c. Raccourcir la durée d'incubation dans la pepsine. Voir la section B.3, étape 2.  S'assurer que l'épaisseur des coupes est de 3 à 6 µm.
7. Niveau élevé d'autofluorescence verte sur la lame, y compris dans les zones sans tissu fixé au formol et inclus en paraffine	7. Utilisation de lames de verre périmées ou déconseillées	7. S'assurer que la date de péremption des lames de verre revêtues (lames silanisées Dako Silanized Slides, réf. S3003, ou lames revêtues de poly-L-lysine) n'a pas été dépassée.

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

**Annexe 4 – Estomac****HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731**

## Liste de contrôle du protocole

ID du registre du cycle de coloration : \_\_\_\_\_

Date du cycle :

HER2 IQFISH pharmDx, K5731, lot :

ID de l'échantillon :

ID du matériel :

Date de dilution/de préremption du tampon de lavage 1x (flacon 6 dilué au 1/20ème) : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Tissu fixé au formol neutre tamponné	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
--------------------------------------	------------------------------	------------------------------

<b>Étape 1 : prétraitement</b>		
Date de dilution/de préremption de la solution de prétraitement (flacon 1 dilué au 1/20ème)		
Température mesurée de la solution de prétraitement (95 à 99 °C) si le chauffage se fait au bain-marie	°C	
Prétraitement (10 minutes) et refroidissement (15 minutes)		
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)		
<b>Étape 2 : pepsine</b>		
Durée du traitement à la pepsine (flacon 2A) à 37 °C ou	minutes	
Durée du traitement à la pepsine (flacon 2A) à température ambiante (20-25 °C) ou	minutes	
Durée de l'immersion dans la pepsine à 37 ( $\pm 2$ ) °C	minutes	
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)		
Déshydratation des lames (3 x 2 minutes) dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées et séchage à l'air libre		
<b>Étape 3 : mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH</b>		
Application du mélange de sondes (flacon 3), mise en place d'une lamelle et étanchéisation avec de l'étanchéisant pour lamelle de protection		
Température mesurée de la dénaturation (66 ( $\pm 1$ ) °C)	°C	
Dénaturation pendant 10 minutes		
Température mesurée de l'hybridation (45 ( $\pm 2$ ) °C)	°C	
Durée d'hybridation (60 à 120 minutes)	minutes	
<b>Étape 4 : lavage stringent</b>		
Date de dilution/de préremption du tampon de lavage stringent (flacon 4 dilué au 1/20ème)	/	
Température mesurée du tampon de lavage stringent (63 ( $\pm 2$ ) °C)	°C	
Lavage stringent (10 minutes) après retrait des lamelles de protection		
Lavage dans le tampon de lavage (flacon 6 dilué au 1/20ème) (2 x 3 minutes)	°C	
Déshydratation des lames (3 x 2 minutes) dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées et séchage à l'air libre.	minutes	

**Étape 5 : montage**

Application de 15 µL de milieu de montage pour la fluorescence (flacon 5) et mise en place d'une lamelle de protection

Commentaires : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Date et signature du technicien : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Annexe 5 – Estomac*****HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731*****Schéma d'évaluation**

HER2 IQFISH pharmDx, K5731, lot : \_\_\_\_\_ ID du registre du cycle de coloration : \_\_\_\_\_

Date du cycle : \_\_\_\_\_ ID de l'échantillon : \_\_\_\_\_

**Caractéristiques de la répartition des signaux dans le tissu :**Homogène : Hétérogène – focalisée :  ou Hétérogène – mosaïque : 

Comptage des signaux dans 20 noyaux					
Nº du noyau	Rouge (HER2)	Vert (CEN-17)	Nº du noyau	Rouge (HER2)	Vert (CEN-17)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Total 1 à 10			Total 11 à 20		

Pour déterminer le rapport HER2/CEN-17, compter le nombre de signaux HER2 et celui des signaux CEN-17 dans les 20 mêmes noyaux et diviser le nombre total de signaux HER2 par le nombre total de signaux CEN-17. Si le rapport HER2/CEN-17 se situe à la limite (1,8 à 2,2), compter 40 noyaux de plus et recalculer le rapport (se référer au schéma d'évaluation pour le nouveau décompte).

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

HER2 FISH	HER2	CEN-17	Rapport HER2/CEN-17
SCORE TOTAL (1 à 20)			

- Rapport < 2 : aucune amplification du gène HER2 observée
- Rapport ≥ 2 : amplification du gène HER2 observée

Date et signature du technicien : \_\_\_\_\_

Date et signature du pathologiste : \_\_\_\_\_

*Pour des recommandations sur l'évaluation : voir la section Interprétation de la coloration.*

**Annexe 6 – Estomac****HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731****Schéma d'évaluation du nouveau décompte**

HER2 IQFISH pharmDx, K5731, lot : \_\_\_\_\_

ID du registre du cycle de coloration : \_\_\_\_\_

Date du cycle : \_\_\_\_\_

ID de l'échantillon : \_\_\_\_\_

Signaux dans les 40 noyaux supplémentaires (1 à 40)											
Nº du noyau	Rouge HER2	Vert CEN-17	Nº du noyau	Rouge HER2	Vert CEN-17	Nº du noyau	Rouge HER2	Vert CEN-17	Nº du noyau	Rouge HER2	Vert CEN-17
1			11			21			31		
2			12			22			32		
3			13			23			33		
4			14			24			34		
5			15			25			35		
6			16			26			36		
7			17			27			37		
8			18			28			38		
9			19			29			39		
10			20			30			40		
Total 1 à 10			Total 11 à 20			Total 21 à 30			Total 31 à 40		

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

HER2 FISH	HER2	CEN-17	Rapport HER2/CEN-17
SCORE TOTAL (1 à 40)			

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

Date et signature du technicien : \_\_\_\_\_

Date et signature du pathologiste : \_\_\_\_\_

Pour des recommandations sur l'évaluation : voir la section *Interprétation de la coloration*.

## Annexe 7 – Estomac

### **HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731**

#### **Spécifications du microscope à fluorescence**

**Dako recommande le matériel suivant pour une utilisation avec le test HER2 IQFISH pharmDx, réf. K5731 :**

#### **1. Type de microscope**

- Microscope à épifluorescence.

#### **2. Lampe**

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

#### **3. Objectifs**

- Pour le passage en revue rapide du tissu, des objectifs de fluorescence secs 10X ou à immersion d'huile 16X conviennent.
- Pour un fort grossissement et l'évaluation des signaux, seuls des objectifs de fluorescence à immersion d'huile, par ex. 100X, sont recommandés.

#### **4. Filtres**

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

- Filtre DAPI
- Filtre double Texas Red/FITC
- Les filtres Texas Red et FITC simples peuvent être utilisés pour la confirmation.

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

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

#### **5. Huile**

- Huile non fluorescente.

#### **Précautions d'emploi**

- L'emploi d'une lampe à mercure de 50 watts est déconseillé.
- Les filtres de la rhodamine ne peuvent pas être utilisés.
- Les filtres triple bande sont déconseillés.

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

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

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

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

**DEUTSCH****Verwendungszweck**

In-vitro-Diagnostikum.

*HER2* IQFISH pharmDx ist ein In-situ-Hybridisierungsassay unter direkter Fluoreszenz (FISH) für die quantitative Bestimmung der *HER2*-Genamplifikation in formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Mammakarzinom-Schnitten und FFPE-Proben von Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs.

*HER2* IQFISH pharmDx ist als Ergänzung zum HercepTest™ für die Untersuchung von Patientinnen indiziert, für die eine Behandlung mit Herceptin™ (Trastuzumab) in Erwägung gezogen wird (siehe Herceptin™ Fachinformation).

Mit dem *HER2* IQFISH pharmDx erhaltene Resultate dienen als Ergänzung zu den klinisch-pathologischen Informationen, die gegenwärtig für die Erhebung der Prognose bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom, Stadium II, mit positivem Lymphknotenbefund genutzt werden.

Das Adenokarzinom des Magens, einschließlich des gastroösophagealen Übergangs, wird in diesem Dokument auch als Magenkrebs bezeichnet.

Für Anwendungen bei einem Mammakarzinom siehe Seite 117–142.

Für Anwendungen bei Magenkrebs siehe Seite 143–171.

**Wichtig: Im Abschnitt „Auswertung der Färbeergebnisse“ bitte besonders die Unterschiede zwischen Brustkrebsgewebe und Magenkrebsgewebe beachten.**

## Zusammenfassung und Erläuterung – Brustkrebs

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

Bei einem gewissen Anteil von Mammakarzinomen erfolgt die Amplifikation des *HER2*-Gens im Zuge der malignen Transformation und der Tumorprogression (3-8). Generell führt die *HER2*-Genamplifikation zur Überexpression des *HER2*-Proteins auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen (9).

Bei 25–30 % der Mammakarzinome wurde eine Amplifikation des *HER2*-Gens und/oder eine Überexpression seines Proteins nachgewiesen. Diese Hochregulierung geht einher mit schlechter Prognose, erhöhtem Rezidivrisiko und verkürzter Überlebenszeit. In mehreren Studien wurde aufgezeigt, dass der *HER2*-Status mit der Empfindlichkeit für oder der Resistenz gegen bestimmte Chemotherapieschemata korreliert (10).

Der Nachweis einer hohen Überexpression des *HER2*-Proteins oder einer *HER2* Genamplifikation ist für die Einleitung der Behandlung mit Herceptin™, einem monoklonalen Antikörper gegen das *HER2*-Protein, unerlässlich. Klinische Studien haben den Nachweis erbracht, dass Patientinnen, deren Tumoren eine starke Überexpression des *HER2*-Proteins und/oder eine Amplifikation des *HER2*-Gens zeigen, am meisten von der Behandlung mit Herceptin™ profitieren (11).

## Prinzip des Testverfahrens – Brustkrebs

Im *HER2* IQFISH pharmDx sind alle Hauptreagenzien enthalten, die zur Durchführung eines FISH-Verfahrens an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten benötigt werden.

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung werden Proben in Vorbehandlungslösung erwärmt. Der nächste Schritt dient der proteolytischen Andauung mit Pepsin. Nach den Vorbehandlungsschritten des Erwärmens und der proteolytischen Vorbehandlung nutzt dieses Kit einen nicht toxischen gebrauchsfertigen „IQISH Probe Mix“ (Sondenmischung), basierend auf einer Kombination aus PNA-(Peptid-Nukleinsäure; peptide nucleic acid)- (12) und DNA-Technologie. Diese Sondenmischung besteht aus einer Mischung von mit Texas Red markierten DNA-Sonden, die eine Region von 218 kb – einschließlich des *HER2*-Gens auf Chromosom 17 – abdecken und einer Mischung aus Fluorescein-markierten PNA-Sonden, die auf die Zentromer-Region von Chromosom 17 (CEN-17) abzielen. Die spezifische Hybridisierung der beiden Zielbereiche bewirkt die Bildung eines deutlichen roten Fluoreszenzsignals an jedem *HER2*-Genlokus und eines deutlichen grünen Fluoreszenzsignals an jedem der Zentromere von Chromosom 17. Nach dem Stringenzwaschschritt werden die Proben mit DAPI-haltigem Fluoreszenz-Eindeckmedium auf Objektträgern aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Mit einem mit den angemessenen Filtern (siehe Anhang 3) versehenen Fluoreszenzmikroskop werden die Tumorzellen lokalisiert und es erfolgt eine Auszählung der roten (*HER2*) und grünen (CEN-17) Signale. Daraufhin wird das *HER2*/CEN-17-Verhältnis berechnet. Im untersuchten Gewebeschnitt vorliegende normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle der Effizienz der Vorbehandlung und Hybridisierung. Weitere Einzelheiten finden sich im Abschnitt über die Auswertung der Färbeergebnisse.

Für das interaktive e-Learning verwenden Sie bitte das *HER2* IQFISH pharmDx e-Learning-Programm, das Labortechnikern, Pathologen und Wissenschaftlern akkurat und schnell Kenntnisse vermittelt, wie sie mit dem *HER2* IQFISH pharmDx optimale Ergebnisse erzielen: [www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Reagenzien – Brustkrebs

### Mitgelieferte Materialien

Die unten angeführten Kitmaterialien reichen für 20 Tests aus (Definition eines Tests: Zielbereich von 22 mm x 22 mm). Die Anzahl der Tests ergibt sich aus der Verwendung von 250 µL pro Objektträger aus Flasche 2 (5–8 Tropfen), 10 µL pro Objektträger aus Flasche 3 und 15 µL pro Objektträger aus Flasche 5. Die Lösungen aus Flasche 3 und Flasche 5 sind zähflüssig und müssen u.U. kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugiert werden, um das gesamte gelieferte Reagenz zu gewinnen.

Das Kit enthält Materialien, die für 10 einzelne Färbedurchläufe ausreichen (vier separate Durchläufe, wenn die Pepsin-Eintauchmethode angewandt wird). HER2 IQFISH pharmDx wird auf Trockeneis geliefert. **Um sicher zu sein, dass Kitkomponenten während des Transports keinen hohen Temperaturen ausgesetzt wurden, muss bei Entgegennahme des Kits immer noch Trockeneis vorhanden sein.** Hinweis: Einige Kit-Komponenten können nicht tiefgefroren sein. Dies übt keinen nachteiligen Einfluss auf die Leistung des HER2 IQFISH pharmDx aus.

<b>Flasche 1</b>	<b>PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)</b>
	<b>Pre-Treatment Solution (20x)</b>
	150 mL, 20-fach konzentriert
	MES-(2-[N-Morpholin]ethansulfonsäure-) Puffer.
<b>Flasche 2A</b>	<b>PEPSIN</b>
	<b>Pepsin</b>
	4 x 6,0 mL, gebrauchsfertig
	Pepsinlösung, pH 2,0, mit Stabilisierungsmittel und antimikrobiellem Wirkstoff.
<b>Flasche 2B</b>	<b>PEPSIN DILUENT (10x)</b>
	<b>Pepsin Diluent (10x)</b>
	24 mL, 10-fach konzentriert
	Verdünnungspuffer, pH 2,0, mit antimikrobiellem Wirkstoff.
<b>Flasche 3</b>	<b>HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX</b>
	<b>HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix</b>
	0,2 mL, gebrauchsfertig
	Mischung aus Texas Red-markierten HER2-DNA-Sonden und Fluorescein-markierten CEN-17-PNA-Sonden in IQISH-Hybridisierungspuffer.
<b>Flasche 4</b>	<b>STRINGENT WASH BUFFER (20x)</b>
	<b>Stringent Wash Buffer (20x)</b>
	150 mL, 20-fach konzentriert
	SSC-Puffer (saline-sodium citrate; NaCl + Natriumzitrat) mit Detergents (Tween-20).
<b>Flasche 5</b>	<b>FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM</b>
	<b>Fluorescence Mounting Medium</b>
	0,4 mL, gebrauchsfertig
	Fluoreszenz-Eindeckmedium mit 500 µg/L DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol).

**Flasche 6****WASH BUFFER (20x)**

**Wash Buffer (20x)**  
500 mL, 20-fach konzentriert  
Tris/HCl-Puffer.

**COVERSLIP SEALANT**

**Coverslip Sealant**  
1 Tube, gebrauchsfertig  
Lösung für das wieder entfernbare Versiegeln von  
Deckgläsern.

**HINWEIS:** Folgende Kit-Reagenzien: Vorbehandlungslösung (20x), Pepsin, Pepsin Diluent (10x), Stringenzwaschpuffer (20x), Fluoreszenz-Eindeckmedium, Waschpuffer (20x) und Deckglas-Abdichtmittel können durch die entsprechenden Reagenzien im Histology FISH Accessory-Kit von Dako, Code-Nr. K5799, ausgetauscht werden.

**Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)****Laborreagenzien**

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Ethanol, 96%ig

Xylol oder Xylol-Ersatz

**Laborausstattungen/-geräte**

Saugfähige Wischtücher

Einstellbare Pipetten

Kalibriertes Thermometer für die teilweise Immersion (Messbereich: 37–100 °C)

Kalibriertes Oberflächenthermometer (Messbereich: 37–100 °C)

Deckgläser (22 mm x 22 mm)

Pinzette

Abzugshaube

Heizblock oder Hybridisierungsofen\*

Feuchtigkeitskammer für die Hybridisierung\*

Mikrozentrifuge

Objektträger, Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (siehe Abschnitt zur Probenvorbereitung)

Färbeschalen oder -bäder

Kurzzeitwecker (auf Zeitabstände zwischen 2–15 Minuten ausgelegt)

Vortexer

Wasserbad mit Deckel (darauf ausgelegt, eine Temperatur von 37 (±2) °C, 63 (±2) °C und von 95 °C bis 99 °C aufrechtzuerhalten)

Mikrowellenherd mit Temperatursensor, falls Vorbehandlung mit Mikrowellenherd erfolgt (siehe B.3 Färbeprotokoll. Schritt 1: Vorbehandlung, Methode B)

\* Für Denaturierung und Hybridisierung können Geräte eingesetzt werden, die die gleichen Bedingungen wie beschrieben bieten.

**Mikroskopausstattungen und -zubehör**

Filter für das Fluoreszenzmikroskop: DAPI- und FITC/Texas Red-Doppelfilter oder FITC- und Texas Red-Monofilter – weitere Einzelheiten siehe Anhang 3.

Es wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einer 100-Watt-Quecksilberdampflampe empfohlen. Andere Lichtquellen werden bei diesen Filtern nicht empfohlen.

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

## Vorsichtsmaßnahmen – Brustkrebs

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Stringent Wash Buffer (20x) ist wie folgt gekennzeichnet: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
4. Pepsin ist wie folgt gekennzeichnet:



### Gefahr

Enthält: Reaktionsmasse von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

H314	Verursacht schwere Hautverbrennungen und Augenschäden.
H317	Kann eine allergische Hautreaktion verursachen.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P304 + P340 + P310	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P301 + P310 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen. Kein Erbrechen einleiten.
P303 + P361 + P353 + P310	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P305 + P310	BEI AUGENKONTAKT: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

5. Pepsin Diluent (10x), ist wie folgt gekennzeichnet:



### Gefahr

Enthält: Reaktionsmasse von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündlich.
H314	Verursacht schwere Hautverbrennungen und Augenschäden.
H317	Kann eine allergische Hautreaktion verursachen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Rauchen verboten.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P304 + P340 + P310	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P301 + P310 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen. Kein Erbrechen einleiten.
P303 + P361 + P353 + P310	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P305 + P310	BEI AUGENKONTAKT: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

## 6. HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix ist wie folgt gekennzeichnet:

**Achtung**

Enthält: Dextran-Natriumsulfat, Ethylencarbonat

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P260	Dämpfe nicht einatmen.
P304 + P340 + P312	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

## 7. Wash Buffer (20x) ist wie folgt gekennzeichnet:

**Achtung**

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P305 + P351 + P338	BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen.

8. Coverslip Sealant ist wie folgt gekennzeichnet:

**Gefahr**

Enthält: hydroraffiniertes Naphtha (Leichtpetroleum)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündlich.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Rauchen verboten.
P241	Explosionsgeschützte elektrische Anlagen/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen und Transportanlagen verwenden.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P304 + P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P303 + P361 + P353	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen.
P235	Kühl halten.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

9. Sowohl vor als auch nach der Fixierung ist mit biologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu beachten(13). Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Empfindliche Bereiche nach Kontakt mit den Reagenzien mit reichlich Wasser waschen.
10. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden, da dies falsche Ergebnisse hervorrufen könnte.
11. Von den angegebenen Spezifikationen abweichende Inkubationszeiten, Temperaturen oder Methoden können zu fehlerhaften Resultaten führen.
12. Verfahren der Gewebefixierung und Schnittdicken, die von den gemachten Angaben abweichen, können die Gewebemorphologie und/oder die Signalintensität beeinträchtigen.
13. Während der Hybridisierung ein Verdunsten des HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix vermeiden, indem für ausreichende Feuchtigkeit in der Hybridisierungskammer gesorgt wird.
14. Die Reagenzien wurden zur Verwendung in diesem Test optimal verdünnt. Eine weitergehende Verdünnung kann zu einem Leistungsverlust führen.
15. Um einen Kontakt mit Augen und Haut zu vermeiden, ist angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) zu tragen.
16. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
17. Sicherheitsdatenblätter sind auf [www.agilent.com](http://www.agilent.com) zu finden oder auf Anfrage erhältlich.
18. In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen

Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Zusätzliche Informationen bitte dem Sicherheitsdatenblatt (SDS) entnehmen.

19. Bei Eintauchen in Pepsin müssen saubere Färbeschalen verwendet werden (Schritt 2, Methode C).

## Lagerung – Brustkrebs

Den *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* (Behälter 3) bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln aufbewahren. Alle anderen Reagenzien können lichtgeschützt bei  $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Alle Reagenzien tolerieren Gefrierlagerung. Einfrieren und Auftauen der Reagenzien bis zu 10 Mal führt zu keiner Leistungsbeeinträchtigung.

Pepsin, *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* und *Fluorescence Mounting Medium* (Flaschen 2A, 3 und 5) können durch Hitzeeinwirkung beeinträchtigt werden. Diese Kitkomponenten dürfen nicht Raumtemperatur ausgesetzt werden.

*HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung* und *Fluoreszenz-Eindeckmedium* (Flasche 3 und 5) können beeinträchtigt werden, wenn sie zu starkem Licht ausgesetzt werden. Die Lagerung dieser Komponenten oder die Durchführung des Färbeverfahrens darf nicht unter intensiver Lichteinstrahlung, wie z. B. direktem Sonnenlicht, erfolgen.

Das Kit darf nicht nach dem auf dem Außenkarton angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den in der Packungsbeilage beschriebenen aufbewahrt werden, so muss die Reagenzienleistung vom Anwender verifiziert werden (14).

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Folglich ist es wichtig, dass die im untersuchten Gewebeabschnitt vorliegenden gesunden Zellen bewertet werden. Wenn ein unerwartetes Fluoreszenzmuster beobachtet wird, welches durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem *HER2 IQFISH pharmDx* besteht, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

## Probenvorbereitung – Brustkrebs

Die Handhabung von Biopsie-, Exzisions- oder Resektionsproben muss derart erfolgen, dass die Gewebe für die FISH-Analyse erhalten bleiben. Für alle Proben sollten Standardmethoden der Gewebeverarbeitung für das immunzytochemische Anfärben genutzt werden (15).

### Paraffineingebettete Schnitte

Für die Verwendung sind nur in neutralem gepuffertem Formalin konservierte und paraffineingebettete Schnitte geeignet. Von Proben sollten beispielsweise Präparatblöcke mit einer Dicke von 3 mm oder 4 mm angefertigt werden, gefolgt von 18–24 Stunden Fixierung in neutralem gepuffertem Formalin. Die Dehydrierung der Gewebeabschnitte erfolgt dann in einer abgestuften Reihe von Ethanol und Xylol, gefolgt von der Infiltration mit geschmolzenem Paraffin, das auf einer Temperatur von nicht mehr als  $60^{\circ}\text{C}$  gehalten wird. Sachgemäß fixierte und eingebettete Gewebe sind vor dem Anfertigen der histologischen Schnitte und dem Aufziehen auf Objekträgern bei kühler Lagerung ( $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) unbegrenzt haltbar (15-16). Andere Fixiermittel sind nicht geeignet.

Von den Gewebeproben werden Schnitte von 4–6  $\mu\text{m}$  angefertigt.

Die für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation wie auch für die Verifikation des Vorliegens des Tumors benötigten Objekträger werden zur gleichen Zeit vorbereitet. Es wird empfohlen, mindestens 2 Serienschnitte von Gewebeproben anzufertigen: 1 Schnitt wird zum Tumornachweis mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) angefärbt und 1 Schnitt dient der Analyse der *HER2*-Genamplifikation. Es wird empfohlen, die histologischen Schnitte auf Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objekträgern aufzuziehen. Proben sollten bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) innerhalb von 4–6 Monaten nach Anfertigen der Schnitte analysiert werden.

## **GEBRAUCHSANWEISUNG – Brustkrebs**

### **A. Vorbereitung der Reagenzien – Brustkrebs**

Es wird empfohlen, die folgenden Reagenzien vor der Färbung anzusetzen:

#### **A.1 Vorbehandlungslösung**

In Flasche 1 kann Kristallbildung auftreten, Kristalle werden sich jedoch bei Raumtemperatur auflösen. Vor Ansetzen des Reagenzes muss gewährleistet werden, dass keine Kristalle vorliegen.

Aus Flasche 1 (Vorbehandlungslösung 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchte angesetzte Lösung kann einen Monat lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Angesetzte Lösungen mit getrübtem Aussehen müssen entsorgt werden.

#### **A.2 Stringenzwaschpuffer**

Aus Flasche 4 (Stringenzwaschpuffer 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchter angesetzter Puffer kann einen Monat lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Angesetzter Puffer mit getrübtem Aussehen muss entsorgt werden.

#### **A.3 Waschpuffer**

Aus Flasche 6 (Waschpuffer 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchter angesetzter Puffer kann einen Monat lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Angesetzter Puffer mit getrübtem Aussehen muss entsorgt werden.

#### **A.4 Ethanol-Reihe**

Aus einer 96%igen Ethanol-Lösung 3 Gefäße mit jeweils 70%igem, 85%igem und 96%igem Ethanol ansetzen. Abgedeckte Gefäße bei Raumtemperatur oder 2-8 °C aufbewahren und für maximal 200 Objekträger verwenden. Angesetzte Lösungen mit getrübtem Aussehen müssen entsorgt werden.

#### **A.5 Pepsinlösung**

Pepsinlösung wird nur benötigt, wenn die Pepsin-Eintauchmethode (Methode C) zur Anwendung kommt.

Pepsinlösung folgendermaßen vorbereiten:

Bei einem Behälter für sechs Objekträger 60 mL Pepsinlösung zubereiten:

48 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur (20–25 °C) in den Behälter geben.

6 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin-Verdünnungsmittel (10x) (Flasche 2B) hinzugeben.

6 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin (Flasche 2A) hinzugeben.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 (±2) °C annehmen lassen.

Bei einem Behälter für 24 Objekträger 240 mL Pepsinlösung zubereiten:

192 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur (20-25 °C) in den Behälter geben.

24 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin-Verdünnungsmittel (10x) (Flasche 2B) hinzugeben.

24 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin (Flasche 2A) hinzugeben.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 (±2) °C annehmen lassen.

Die Pepsinlösung innerhalb von 5 Stunden nach dem Aufwärmen verbrauchen.

## B. Färbeverfahren – Brustkrebs

### B.1 Verfahrenshinweise

Vor der Verwendung sind alle diese Anleitungen durchzuarbeiten und Benutzer sollten sich mit allen Kitkomponenten vertraut machen (siehe „Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen“).

Alle Reagenzien sind vor ihrer Verwendung wie folgt auf die jeweilige Temperatur zu bringen:

**Flasche 1:** Die verdünnte Vorbehandlungslösung wird auf **95-99 °C** erwärmt, falls die Vorbehandlung in einem Wasserbad erfolgt (B.3 Färbeprotokoll, Schritt 1: Vorbehandlung, Methode A). Falls ein Mikrowellenherd mit Temperatursensor für die Vorbehandlung verwendet wird (B.3 Färbeprotokoll, Schritt 1: Vorbehandlung, Methode B), sollte die Vorbehandlungslösung auf Raumtemperatur 20–25 °C erwärmt werden.

**Flasche 2A:** Pepsin ist bei **2-8 °C** (B.3 Färbeprotokoll, Schritt 2: Methode A und B) aufzubringen und muss ständig gekühlt gehalten werden

**Flasche 2B:** Pepsin Diluent (10x) ist bei **2-8 °C** (B.3 Färbeprotokoll, Schritt 2: Method C) aufzubringen.

**Flasche 3:** HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix trennt sich bei Lagerung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  in zwei Phasen. Vor Gebrauch von Behälter 3 vergewissern, dass nur eine Phase vorhanden ist, indem der Sondenmix auf Raumtemperatur (**20-25 °C**) gebracht und anschließend gemischt wird. Behälter 3 bei Raumtemperatur (20-25 °C) max. 30 Minuten lang auftauen (vor starker Lichteinwirkung schützen), dann den Behälter 15 Sekunden lang bei 2500 U/min mit einem Vortex-Mischer gründlich vortexen. Behälter 3 sofort nach der Verwendung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

**Flasche 4:** Verdünnter Stringenzwaschpuffer – ein Gefäß sollte vor Verwendung auf Raumtemperatur und ein Gefäß auf **63 ( $\pm 2$ ) °C** gebracht werden.

**Flasche 5:** Fluorescence Mounting Medium kann bei jeder beliebigen Temperatur zwischen **2 °C und 25 °C** aufgebracht werden.

**Flasche 6:** Der verdünnte Diluted Wash Buffer sollte auf Raumtemperatur **20-25 °C** gebracht werden.

Das **Deckglas-Abdichtmittel** kann bei jeder beliebigen Temperatur zwischen **2 °C und 25 °C** aufgebracht werden.

### Alle Schritte müssen bei den angegebenen Temperaturbereichen durchgeführt werden.

Das Verfahren schließt eine Reihe von Dehydrierungsschritten ein, an die sich das Trocknen der Gewebeschnitte anschließt. Das vollständige Trocknen der Gewebeschnitte muss gewährleistet werden, bevor mit dem nächsten Schritt fortgefahrt wird. Während weiterer Schritte des Färbeverfahrens dürfen Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Muss das Färbeverfahren unterbrochen werden, können Objektträger nach der Entparaffinierung bis zu 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in Waschpuffer 1 aufbewahrt werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Färberesultate kommt.

### B.2 Behandlung der Gewebeproben vor dem Färben

**Entparaffinierung und Rehydrierung:** Vor Durchführen der Analyse müssen Objektträger mit Gewebeschnitten zum Entfernen des Eindeckmediums entwachst und rehydriert werden. Das Paraffin muss vollständig entfernt werden. Überreste des Eindeckmediums können eine stärkere unspezifische Färbung zur Folge haben. Diesen Schritt bei Raumtemperatur (20–25 °C) durchführen.

1. Die Objektträger in ein Xylolbad stellen und 5 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
2. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 2 ( $\pm 1$ ) Minuten lang in 96%iges Ethanol geben. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
3. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 2 ( $\pm 1$ ) Minuten lang in 70%iges Ethanol geben. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
4. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger mindestens 2 Minuten lang in verdünnten Waschpuffer geben (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG Abschnitt A.3). Das Färbeverfahren, wie in Abschnitt B.3, Schritt 1, Vorbehandlung, erläutert, beginnen.

Xylol- und Alkohollösungen sind nach 200 Objektträgern oder weniger zu erneuern. Es kann Xylol-Ersatz verwendet werden.

**HINWEIS:** Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und Anweisungen wurden für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnungen der Kitreagenzien oder Abänderungen der Inkubationstemperaturen können zu fehlerhaften oder unstimmigen Ergebnissen führen. Unterschiede bei der Gewebeverarbeitung und bei den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können die Ergebnisse des Assays hinfällig machen.

### B.3 Färbeprotokoll

#### Schritt 1: Vorbehandlung

Die Vorbehandlung kann entweder in einem Wasserbad erfolgen, wie unter Methode A) beschrieben, oder alternativ durch Verwendung eines Mikrowellenherds mit Temperatursensor, wie unter Methode B) beschrieben.

##### Methode A: Vorbehandlung mit Wasserbad

Färbebehältnisse, wie z. B. Coplin-Schalen, mit verdünnter Vorbehandlungslösung befüllen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.1). Verdünnte Vorbehandlungslösung enthaltende Färbeschalen in ein Wasserbad stellen. Wasserbad und Vorbehandlungslösung auf 95–99 °C erwärmen. Temperatur innerhalb der Schale mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten. Schalen mit Deckeln versehen, um eine Temperaturstabilisierung zu erreichen und um Verdunsten zu vermeiden.

Die auf Raumtemperatur gebrachten entparaffinierten Schnitte in die vorgewärmte Vorbehandlungslösung in den Färbeschalen einlegen. Temperatur erneut messen und 10 ( $\pm 1$ ) Minuten lang bei 95–99 °C inkubieren.

Gesamte Färbeschale samt Objektträger aus dem Wasserbad heben. Deckel abnehmen und die Objektträger 15 Minuten lang in der Vorbehandlungslösung bei Raumtemperatur abkühlen lassen.

Objektträger 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in eine Färbeschale mit verdünntem Waschpuffer geben (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.3).

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen.

**HINWEIS:** Die Vorbehandlungslösung ist ausschließlich für den Einmalgebrauch ausgelegt. Nicht wiederverwenden.

##### Methode B: Vorbehandlung im Mikrowellenherd mit Temperatursensor

Ein Kunststoffgefäß mit verdünnter Vorbehandlungslösung füllen (Raumtemperatur 20–25 °C). Die entparaffinierten Schnitte in Vorbehandlungslösung tauchen, das Gefäß mit einem punktierten Deckel abdecken und in den Mikrowellenherd stellen. Siedetemperatursensor auswählen und ein Programm, das nach Erreichen der Siedetemperatur 10 Minuten lang weiterläuft.\*

Nach der 10-minütigen Inkubation das Gefäß mit den Objektträgern aus dem Herd nehmen, den Deckel entfernen und 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Objektträger in ein Gefäß mit verdünntem Waschpuffer geben und 3 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) einweichen lassen. Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen.

\* Verwendung eines Mikrowellenherds mit Temperatursensor heißt, der Herd muss mit einem Sensor sowie mit einem Programm ausgestattet sein, das die Vorbehandlungslösung zunächst auf den Siedepunkt erhitzt und danach die erforderliche Vorbehandlungstemperatur (über 95 °C) beibehält, bis die voreingestellte Restzeit (10 ( $\pm 1$ ) Minuten) abgelaufen ist. Einige Mikrowellenherdmodelle mit Temperatursensor bieten unter Umständen nicht die Möglichkeit, eine beliebige Restzeit einzustellen. Falls das Modell lediglich voreingestellte Programme bietet, ist darauf zu achten, ein Programm auszuwählen, das die erforderliche Vorbehandlungstemperatur (über 95 °C) mindestens 10 ( $\pm 1$ ) Minuten lang beibehält, und das Programm nach 10 ( $\pm 1$ ) Minuten manuell zu stoppen.

**HINWEIS:** Die Vorbehandlungslösung ist ausschließlich für den Einmalgebrauch ausgelegt. Nicht wiederverwenden.

#### Schritt 2: Pepsin, gebrauchsfertig, oder Pepsinlösung

Die Pepsin-Inkubation kann durch direktes Aufbringen der gebrauchsfertigen Pepsintropfen auf die Objektträger bei Raumtemperatur (20–25 °C) (Methode A) oder bei 37 °C (Methode B)

erfolgen. Alternativ können die Objektträger in eine Pepsinlösung eingetaucht und bei 37 ( $\pm 2$ ) °C inkubiert werden (Methode C).

#### Methode A und Methode B:

Überschüssigen Puffer abklopfen. Mit einem flusenfreien Tuch (wie z. B. einem saugfähigen Labortuch oder Gazetupfer) vorsichtig rund um die Probe alle verbleibende Flüssigkeit abwischen und dafür sorgen, dass Reagenzien innerhalb des vorgeschriebenen Bereichs verbleiben.

5–8 Tropfen (250 µL) kaltes (2–8 °C) Pepsin (Flasche 2A) zum Bedecken der Probe aufbringen. Pepsin immer bei 2–8 °C lagern.

#### Methode A: Pepsin, gebrauchsfertig – Inkubation bei 20–25 °C

5–15 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 5–15 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin abklopfen und Schnitte 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in verdünntem Waschpuffer einweichen lassen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.3).

Verdünnten Waschpuffer ersetzen und die Schnitte weitere 3 Minuten lang einweichen. Weiter mit Dehydrierung.

#### Methode B: Pepsin, gebrauchsfertig – Inkubation bei 37 °C

Gewebe mit Pepsin bei 37 °C auf einen Heizblock geben und 3–5 Minuten inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 3–5 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin durch Abklopfen entfernen und Gewebeschnitte in verdünntem Waschpuffer 3 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) einweichen lassen.

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen. Weiter mit Dehydrierung.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte an der Luft vollständig trocknen lassen.

#### Methode C: Pepsinlösung – Eintauchen der Objektträger in 37 °C warme Pepsinlösung

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für vier separate Durchläufe (60 mL Pepsinlösung, kleiner Behälter für sechs Objektträger) oder einen einzelnen Durchlauf (240 mL Pepsinlösung, großer Behälter für 24 Objektträger). Pepsinlösung, wie in Abschnitt A.5 beschrieben, vorbereiten.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 ( $\pm 2$ ) °C annehmen lassen. Die Temperatur muss stabil bleiben. Temperatur im Behälter mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten.

Überschüssigen Waschpuffer abklopfen. Objektträger in die 37 ( $\pm 2$ ) °C warme Pepsinlösung eintauchen und 20–30 Minuten lang inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 20–30 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin durch Abklopfen entfernen und Gewebeschnitte in verdünntem Waschpuffer 3 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) einweichen lassen.

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen. Weiter mit Dehydrierung.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte an der Luft vollständig trocknen lassen.

### Schritt 3: HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung

Die HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung trennt sich bei der Lagerung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  in zwei Phasen. Vor Gebrauch von Flasche 3 gewährleisten, dass nur eine Phase vorliegt, indem die Sondenmischung auf Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) erwärmt und danach gemischt wird. Flasche 3 bei Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) höchstens 30 Minuten lang (vor starkem Licht geschützt) auftauen, dann die Flasche gründlich 15 Sekunden lang bei 2500 U/min mit dem Vortexer aufschütteln. Flasche 3 sofort nach dem Gebrauch bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  aufbewahren. 10  $\mu\text{L}$  HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung (Flasche 3) im Zentrum des Gewebeschnitts aufbringen. Sofort über der Sondenmischung ein Deckglas von 22 mm x 22 mm Größe auflegen und Sondenmischung sich gleichmäßig unter dem Deckglas ausbreiten lassen. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Sollten Luftblasen festgestellt werden, werden sie mit der Pinzette vorsichtig aus dem Gewebe herausgeklopft.

**Daran denken, Flasche 3 sofort nach dem Gebrauch bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  aufzubewahren.**

Deckglas mit Coverslip Sealant absiegeln, indem das Abdichtmittel rund um die Peripherie des Deckglases aufgetragen wird. Das Coverslip Sealant das Deckglas und den Objektträger so überlappen lassen, dass es eine Abdichtung rund um das Deckglas bildet. Das Coverslip Sealant muss den gesamten Rand des Deckglases abdecken.

Objektträger auf eine ebene Metall- oder Keramikoberfläche (Heizblock oder Block eines Hybridisierungsofens) legen, die auf  $66 (\pm 1)^{\circ}\text{C}$  vorgeheizt wurde. Genau 10 Minuten lang denaturieren lassen. Objektträger in eine vorgeheizte befeuchtete Hybridisierungskammer legen. Kammer mit Deckel versehen und 60-120 Minuten\* lang bei  $45 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  inkubieren. Bitte beachten, dass eine Hybridisierungstemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  nicht für die in diesem Kit enthaltenen Sonden geeignet ist.

\* Für Denaturierung und Hybridisierung können Geräte eingesetzt werden, die die gleichen Bedingungen wie oben beschrieben bieten.

### Schritt 4: Waschen mit Stringenzwaschpuffer

Zwei Färbebehältnisse, wie z. B. Coplin-Schalen, mit verdünntem Stringenzwaschpuffer befüllen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.2). Für jede Schale wird ein Mindestvolumen von 100 mL oder von 15 mL pro Objektträger empfohlen.

Eine Färbeschale mit verdünntem Stringenzwaschpuffer bei Raumtemperatur unter einer Abzugshaube und die andere Färbeschale in ein Wasserbad stellen. Das Wasserbad mit dem verdünnten Stringenzwaschpuffer auf  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  erwärmen. Die Temperatur muss stabil bleiben. Schale mit Deckel versehen, um eine Temperaturstabilisierung zu erreichen und um Verdunsten zu vermeiden. Temperatur innerhalb der Schale im Wasserbad mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten. Der Stringenzwaschpuffer enthält ein Detergens, das bei  $63^{\circ}\text{C}$  ein getrübtes Aussehen annehmen kann. Die Leistung wird hierdurch nicht beeinträchtigt.

Mit einer Pinzette oder behandschuhten Händen die Objektträger aus der Hybridisierungskammer nehmen. Vorsichtig Deckglas-Abdichtmittel ebenso wie das Deckglas entfernen und die Objektträger jeweils einen nach dem anderen in die Raumtemperatur aufweisende Schale für den Vorwaschschnitt geben.

Sobald alle Deckel entfernt worden sind, die Objektträger wieder aus der Vorwaschsenschale mit der raumwarmen Lösung herausnehmen und in die  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  warme Schale im Wasserbad legen.

Sofort nach Übertragen der Objektträger in den  $63 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$  warmen verdünnten Stringenzwaschpuffer im Wasserbad ist der Kurzzeitwecker zu starten. Waschen mit Stringenzwaschpuffer genau 10 Minuten lang durchführen.

Objektträger aus dem verdünnten Stringenzwaschpuffer herausheben und Schnitte 3 Minuten lang bei Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) in verdünntem Waschpuffer einweichen.

Verdünnten Waschpuffer ersetzen und Schnitte 3 weitere Minuten lang einweichen.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte vollständig trocknen lassen.

### Schritt 5: Fixierung

Auf dem Zielbereich des Objektträgers 15 µL Fluoreszenz-Eindeckmedium mit DAPI (Flasche 5) aufbringen und mit einem Deckglas eindecken.

**HINWEIS:** Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger kann nach 15 Minuten oder innerhalb von 7 Tagen nach dem Präparateinschluss erfolgen. Es kommt allerdings zu Verbllassen, falls die Objektträger Licht oder hohen Temperaturen ausgesetzt werden. Um ein Verbllassen auf dem Minimum zu halten, sind die Objektträger bei -18 °C bis 8 °C im Dunkeln aufzubewahren.

## Qualitätskontrolle – Brustkrebs

1. Signale müssen hell, deutlich und leicht zu bewerten sein.
2. Normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle für den Färbungsdurchgang.
  - Normale Zellen müssen 1–2 deutlich sichtbare, grüne Signale aufweisen, ein Anzeichen dafür, dass die CEN-17-PNA-Sonde erfolgreich an die Zentromerregion von Chromosom 17 hybridisiert wurde.
  - Gesunde Zellen sollten außerdem 1–2 deutlich sichtbare rote Signale erbringen und darauf hinweisen, dass die HER2-DNA-Sonde erfolgreich an das HER2-Amplicon angelagert hat.
  - Durch das Schneiden des Gewebes weisen einige der normalen Zellen weniger als die erwarteten 2 Signale der einzelnen Farben auf.
  - Das Ausbleiben von Signalen in normalen Zellen zeigt das Versagen des Assays an, die Ergebnisse sind für ungültig zu erklären.
3. Bei der Bewertung mit einem DAPI-Filter muss die Zellkernmorphologie intakt sein. Zahlreiche Schattenzellen und eine insgesamt schlechte Zellkernmorphologie sind Anzeichen für eine zu starke Andauung der Probe, die zum Signalverlust bzw. zur Signalfragmentierung führen kann. Solche Proben müssen als ungültig angesehen werden.
4. Unterschiede bei der Gewebefixierung und -eindeckung im Labor des Anwenders können Variationen der Resultate hervorrufen und eine regelmäßige Evaluation der laborinternen Kontrollen erforderlich machen.

## Auswertung der Färbeergebnisse – Brustkrebs

### Bewertbares Gewebe

Eine Untersuchung ist nur bei Proben von Patientinnen mit invasivem Karzinom vorzunehmen. Sind in einer Probe sowohl ein Carcinoma in situ als auch ein invasives Karzinom vorhanden, so ist nur die invasive Komponente zu bewerten. Nekrotische Bereiche sind ebenso wie Bereiche mit nicht eindeutigen Zellkernrändern auszuklammern. Es dürfen keine Zellkerne einbezogen werden, bei denen ein subjektives Urteil gefällt werden muss. Zellkerne mit schwacher Signalintensität und unspezifischer oder hoher Hintergrundanfärbung sind zu übergehen.

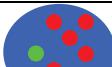
**Signalzählung:** Den Tumor innerhalb des Kontextes des mit dem HE-Verfahren angefärbten Objektträgers lokalisieren und den gleichen Bereich auf dem mit dem FISH-Verfahren verarbeiteten Objektträger bewerten. Mehrere Tumorzellbereiche untersuchen, um mögliche Heterogenität zu berücksichtigen. Einen Bereich mit einer guten Zellkernverteilung auswählen. Mit der Analyse am linken oberen Quadranten des ausgewählten Bereichs beginnen. Die mikroskopische Untersuchung von links nach rechts vornehmen und die Anzahl der Signale innerhalb des nukleären Saums jedes bewerteten Zellkerns nach den unten angeführten Leitlinien auszählen (siehe auch Anhang 3).

- Auf- und abwärts fokussieren, um alle Signale im jeweiligen Zellkern ausfindig zu machen.
- Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.

- In Zellkernen mit hoher HER2-Genamplifikation können die HER2-Signale sehr nah beieinander liegen und einen Cluster von Signalen bilden. In diesen Fällen kann die Anzahl der HER2-Signale nicht gezählt, sondern muss geschätzt werden. Besondere Aufmerksamkeit muss den grünen Signalen gewidmet werden, da Cluster von HER2-Signalen die grünen Signale verdecken können, sodass sie nicht sichtbar sind. Im Zweifelsfall sind die grünen Signale mithilfe eines spezifischen FITC-Filters zu kontrollieren.

Zellkerne ohne Signale oder mit nur eine Farbe aufweisenden Signalen dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden. Nur solche Zellkerne bewerten, die mindestens ein FISH-Signal jeder Farbe zeigen.

#### Leitfaden für die Signalzählung

1		Nicht in die Zählung aufnehmen. Zellkerne überschneiden sich, es sind nicht alle Bereiche des Zellkerns sichtbar.
2		Zwei grüne Signale; Zellkerne mit nur einer Signalfarbe dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden.
3		Als 3 grüne und 12 rote Signale zählen (Cluster-Schätzung).
4		Als 1 grünes und 1 rotes Signal zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
5	 oder 	Nicht in die Zählung aufnehmen (übermäßige oder zu geringe Andauung der Zellkerne). Fehlende Signale in der Mitte der Kerne (ringförmige Zellkerne).
6		Als 2 grüne und 3 rote Signale zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
7		Als 1 grünes Signal und 5 rote Signale zählen.
8		Als 3 grüne (1 grünes Signal nicht im Fokus) und 3 rote Signale zählen.
9		Cluster roter Signale kaschieren grüne Signale. Grüne Signale mit einem spezifischen FITC-Filter überprüfen oder nicht in die Zählung aufnehmen.

Zählungen, wie in Anhang 2 verdeutlicht, in einer Tabelle aufzeichnen.

Pro Gewebeprobe werden 20 Zellkerne ausgezählt, und zwar möglichst von deutlich erkennbaren Tumorbereichen (17).

Das HER2/CEN-17-Verhältnis wie folgt berechnen: Dividieren der Gesamtzahl roter HER2-Signale durch die Gesamtzahl grüner CEN-17-Signale.

Für Proben mit einem HER2/CEN-17-Verhältnis über oder gleich 2 ist die Amplifikation des HER2-Gens anzunehmen (5, 17-19).

Ergebnisse am oder im Bereich vom Cut-off-Wert (1,8–2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Liegt das Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8–2,2), sind 20 weitere Zellkerne auszuzählen, und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen erneut berechnet.

Im Zweifelsfall ist eine erneute Bewertung des Objektträgers vorzunehmen. Bei Grenzfällen sollte eine Beratung zwischen dem Pathologen und dem behandelnden Arzt stattfinden.

## **Einschränkungen – Brustkrebs**

1. FISH ist ein zahlreiche Schritte umfassendes Verfahren, das hinsichtlich der Auswahl der geeigneten Reagenzien sowie der Auswahl, Fixierung und Verarbeitung von Geweben sowie der Vorbereitung des FISH-Objektträgers und der Auswertung der Färbungsergebnisse spezielle Schulung erfordert.
2. Mit dem FISH-Verfahren erhaltene Resultate sind von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färbeschritt abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, falsches Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten können die Sondenhybridisierung beeinflussen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Eideckmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.
3. Die auf Objektträger aufgezogenen Gewebe müssen für optimale und reproduzierbare Ergebnisse vollständig entparaffiniert werden. Diese Paraffinentfernung muss zu Beginn des gesamten Färbeverfahrens abgeschlossen worden sein (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt B.2).
4. Es sind ausschließlich Wasserbäder, Heizblöcke und Hybridisierungsöfen mit geeichten Einrichtungen für die Temperaturregelung zu verwenden. Die Verwendung anderer Gerätetypen muss vom Anwender validiert werden, da es hierbei während der Hybridisierung zum Verdunsten der HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung kommen kann.

## Leistungsmerkmale – Brustkrebs

### Analytische Sensitivität

Bei der Untersuchung der Sensitivität der *HER2/CEN-17* IQISH Sondenmischung wurden 18 Proben von normalem humanem Brustdrüseneipithel verwendet. Auf der Grundlage des Auszählens von 20 Zellkernen je Probe wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl von *HER2*-Signalen und CEN-17-Signalen berechnet.

Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis für die 18 Proben von normalem humanem Brustdrüseneipithel lag zwischen 0,97 und 1,08.

### Analytische Spezifität

Zur Bestätigung einer Gesamtabdeckung von 218 kb einschließlich des *HER2*-Gens wurden die *HER2*-DNA-Sonden in der *HER2/CEN-17* IQISH Sondenmischung einer Endsequenzierung und Kartierung unterzogen.

Die CEN-17-PNA-Sonden in der *HER2/CEN-17* IQISH Sondenmischung wurden einzeln und in Kombination miteinander getestet, um ihre spezifische Hybridisierung der Zentromerregion von Chromosom 17 zu bestätigen.

Um die Eigenschaft des Tests zu bestimmen, allein die Zielsubstanzen *HER2* und CEN-17 ohne Störung durch andere Substanzen zu identifizieren, wurden Untersuchungen an Gewebeproben von normalem humanem Brustdrüseneipithel mit Hilfe von Flasche 3 mit Hybridisierungspuffer, aber ohne Sondenmischung durchgeführt. Insgesamt 18 Proben wurden auf das Vorliegen von Signalen hin bewertet, die nicht mit der Sondenmischung in Zusammenhang standen. In keiner der 18 Proben wurden andere Chromosomen-Zielbereiche entdeckt oder Störungen mit nah verwandten Substanzen beobachtet.

### Studien zur Robustheit

Die Robustheit des *HER2* IQFISH pharmDx Assays wurde geprüft, indem Vorbehandlungszeit, Temperatur und Methoden des Erhitzens des Vorbehandlungspuffers (Mikrowellenherd oder Wasserbad), Pepsin-Inkubationszeit und -Methode (gebrauchsfertiges Pepsin oder Eintauchen), Denaturierungszeit und -temperatur, Hybridisierungszeit und Stringenzwaschzeit und -temperatur geändert wurden.

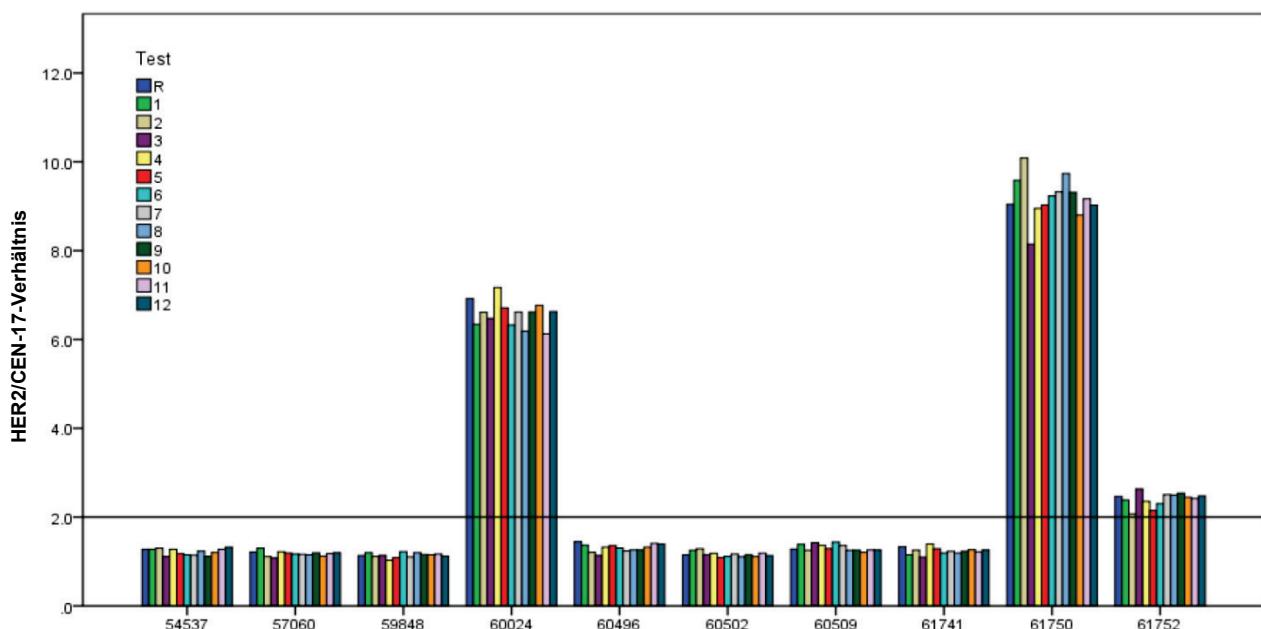
Unter den folgenden Versuchsbedingungen wurde keine signifikante Differenz bei den Resultaten erhalten:

- Vorbehandlung Methode A) Wasserbad für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 95 °C, 95–99 °C und 99 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 95–99 °C
- Vorbehandlung Methode B) Mikrowellenherd für 9, 10 und 11 Minuten bei >95 °C.
- Pepsin-Andauung Methode A) mit Inkubationszeiten von 5, 10 und 15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C).
- Pepsin-Andauung Methode B) mit Inkubationszeiten von 3, 4 und 5 Minuten bei 37 °C.
- Pepsin-Andauung Methode C) mit Inkubationszeiten von 20, 25 und 30 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 35 °C, 37 °C und 39 °C.
- Denaturierung für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 65 °C, 66 °C und 67 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 66 °C. Hybridisierungszeit 60, 90 und 120 Minuten bei 45 °C.
- Stringenzwaschung für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 61 °C, 63 °C und 65 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 63 °C.

**Hinweis:** Bei den Robustheitstests wurde beim Färbeverfahren jeweils nur ein Parameter geändert, während alle anderen Parameter konstant blieben. Es wird empfohlen, die im Färbeverfahren angegebene Zeit und die Temperaturen einzuhalten.

Die Hybridisierung für 60 Minuten ergab eine hohe Signalintensität, obwohl leicht reduziert im Vergleich zur Hybridisierungszeit von 90 und 120 Minuten. Es wurden keine signifikanten Differenzen in den Ergebnissen bei den anderen Zeit-Temperatur-Kombinationen beobachtet.

Das Färbeverfahren für *HER2* IQFISH pharmDx bietet Protokollvariablen für Erwärmungsvorbehandlung, Pepsin-Andauung und Hybridisierungszeit. Jede einzelne Kombinationsoption wurde hinsichtlich des *HER2*-Genstatus validiert. Die Validierung erfolgte an 10 humanen FFPE-Brustkrebsproben für jede der 12 möglichen Kombinationsoptionen. Das *HER2* FISH pharmDx-Kit (Code-Nr. K5331) wurde als Referenzmethode verwendet. Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis für jede einzelne Probe ist in Abb. 1 dargestellt. Kreuztabulierungen zwischen den 12 Tests und der Referenzfärbung zeigten insgesamt Übereinstimmung im *HER2*-Genstatus von 100 % (10/10) mit unterem bzw. oberem Grenzwert für das zweiseitige 95%-Konfidenzintervall von 78,3 % bzw. 100 %. Der Kappa-Wert betrug 1,00 und der McNemars-Test ergab das Fehlen eines Bias (zweiseitiger p-Wert 1,00).



**Abb. 1** Einzelne *HER2/CEN-17*-Verhältnisse bei 10 Proben von humanem Brustkrebs, gefärbt mit den 12 Kombinationsvariationen des Protokolls, die beim *HER2* IQFISH pharmDx (Code-Nr. K5731) (Test 1–12) und dem *HER2* FISH pharmDx Kit (Code-Nr. K5331) als Referenz (R) möglich sind. Die horizontale Linie gibt den Cutoff-Wert von 2,0 an.

### Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses wurde mit dem *HER2* IQFISH pharmDx Test mittels aufeinanderfolgender Schnitte von neun Proben von humanem Brustkrebsgewebe mit entweder nicht amplifiziertem oder amplifiziertem *HER2*-Genstatus untersucht. Drei Schnitte von jeder Probe wurden im selben Durchlauf getestet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 5,2 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 1 % bis 8 %) und 14 % für die amplifizierten Proben (Spanne 7 % bis 20 %).

Insgesamt fünf aufeinanderfolgende Schnitte von vier humanen Brustkrebsgeweben mit unterschiedlicher Dicke (3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm und 7 µm) wurden mit dem *HER2* IQFISH pharmDx untersucht. Der durchschnittliche Variationskoeffizient des *HER2/CEN-17*-Verhältnisses betrug 7 % (Spanne 6 % bis 9 %).

### Reproduzierbarkeit

An 3 Chargen von *HER2* IQFISH pharmDx und mit drei Untersuchern wurde der *HER2* IQFISH pharmDx Assay auf die Reproduzierbarkeit Charge-zu-Charge und Untersucher-zu-Untersucher untersucht. Die Reproduzierbarkeit wurde an neun unterschiedlichen humanen Brustkrebsproben mit nicht amplifiziertem und amplifiziertem *HER2*-Genstatus untersucht.

Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Reproduzierbarkeit Charge-zu-Charge betrug 5 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 2 % bis 8 %) und 7,8 % für die amplifizierten Proben (Spanne 5 % bis 11 %).

Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Reproduzierbarkeit Untersucher-zu-Untersucher betrug 3,2 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 0,2 % bis 6 %) und 2,8 % für die amplifizierten Proben (Spanne 2 % bis 4 %).

### Klinischer Nutzen

Der klinische Nutzen des Dako HER2 FISH pharmDx Kit (Code-Nr. K5331) wurde in einer Vergleichsstudie mit dem Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit untersucht. In die Studie wurden 150 archivierte Proben einbezogen, die von Patientinnen mit lymphknotenpositivem und lymphknotennegativem Mammakarzinom, Grad II–III gewonnen worden waren.

Die Zielsetzung der Studie bestand in der Erhebung des Ausprägungsgrades der Konkordanz zwischen den Verhältnissen HER2/Chromosom 17 : Zentromer für die 150 Proben gemäß Prüfung mit den Dako und Vysis Assaykits, wobei sowohl die generelle Übereinstimmung der Verhältnisse als auch die Übereinstimmung der dichotomisierten FISH-Ergebnisse berücksichtigt wurden (positive/negative Gruppen).

Für insgesamt 145 Proben erfolgte eine erfolgreiche Hybridisierung und erfolgreiches Scoring, sodass sie in die statistische Analyse einbezogen werden konnten. Eine 2 x 2 Kreuztabulierung der Ergebnisse wird in Tabelle 1 vorgelegt.

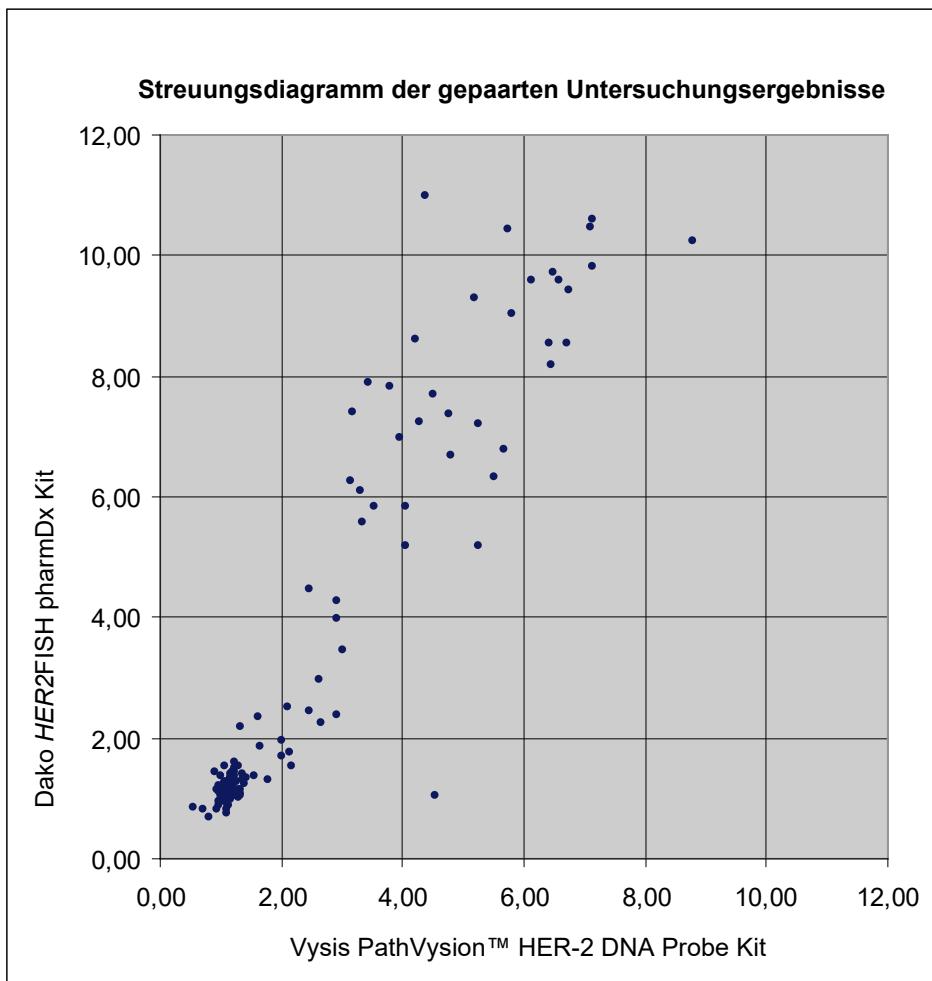
**Tabelle 1. Dichotomisierte Ergebnisse von 145 Mammakarzinomproben – Prüfung mit dem Dako HER2 FISH pharmDx Kit und dem Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit. Mit jedem der beiden Kits wurden 60 Zellkerne jeder Probe bewertet.**

	Dako Kit (-) amplifiziert	Dako Kit (+) amplifiziert	Summe
Vysis Kit (-) amplifiziert	95	2	97
Vysis Kit (+) amplifiziert	5	43	48
Summe	100	45	145

Die Konkordanz zwischen den Dako und Vysis Tests betrug 95 % bei einem Konfidenzintervall von 92–99 %. Der Kappa-Wert betrug 0,89.

Der McNemars-Test für den systematischen Bias zwischen beiden Tests war nicht signifikant ( $p=0,22$ ).

Abbildung 2 zeigt ein Streudiagramm der gepaarten Untersuchungsergebnisse für die 145 Proben.



**Figure 2.** Insgesamt 145 Mammakarzinomproben, untersucht auf HER2-Genamplifikation unter Verwendung des Dako HER2 FISH pharmDx Kit und des Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit. Ergebnisse ausgedrückt als HER2/Chromosom 17 : Zentromer-Verhältnisse. Mit jedem der beiden Kits wurden 60 Zellkerne jeder Probe bewertet.

Die generelle Übereinstimmung zwischen den Dako HER2 FISH pharmDx- und Vysis PathVysion™ HER-2 DNA Probe-Tests wurde anhand einer Analyse der Differenzen zwischen gepaarten Untersuchungen des logarithmischen Verhältnisses und einer linearen Regressionsanalyse des logarithmischen Verhältnisses der beiden Tests untersucht. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Differenz zwischen paarweise angeordneten Beobachtungen des logarithmischen Verhältnisses systematisch um die Summe der HER2/Chromosom 17 : Zentromer-Verhältnisse zunimmt und dass für die höheren Verhältniswerte das gemessene Verhältnis mit dem Dako-Test höher liegt als mit dem Vysis-Test.

Das höhere HER2/Chromosom 17 : Zentromer-Verhältnis, das mit dem Dako HER2 FISH pharmDx Kit beobachtet wurde, kann mit einer echten Differenz zwischen den beiden Tests in Zusammenhang gebracht werden, z. B. dass eine vom Dako HER2 FISH pharmDx Kit erbrachte höhere Auflösung bei Fällen mit starker HER2-Genamplifikation in höheren Verhältnissen resultiert. Die Kitprüfung wurde jedoch an zwei unterschiedlichen Studienzentren durchgeführt, sodass Abweichungen zwischen Labors erwartet werden. Hinzu kommt, dass in der Literatur bei Fällen mit starker Amplifikation eine höhere Variation angegeben wird, die allerdings nicht als klinisch relevant eingeschätzt wird (18). Die vorgelegte Studie gestattet keine über mehrere Laboratorien hinweg reichende Untersuchung einer systematischen Differenz zwischen den beiden Tests. Es sollte hinzugefügt werden, dass die beobachtete Abweichung zwischen den beiden Tests einen ähnlichen Umfang aufweist wie die in der Studie zur Portabilität festgestellte Variation zwischen Studienorten.

Dako *HER2* IQFISH pharmDx (Code-Nr. K5731) wurde in einer Vergleichsstudie an 78 Brustgewebeproben bei humanem Brustkrebs mit dem Dako *HER2* FISH pharmDx Kit (Code-Nr. K5331) verglichen. Die bei beiden Tests ermittelte Kreuztabulierung des *HER2*-Status ergab eine Gesamtübereinstimmung von 98,7 % bei oberen und unteren Grenzwerten des 95%-Konfidenzintervalls von 94,2 % und 99,9 %. Der Kappa-Wert betrug 0,96 bei einem unteren und oberen Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls von 0,89 und 1,00. Der p-Wert beim McNemars-Test betrug 1,00, was auf einen fehlenden Bias zwischen den zwei Tests hinweist.

## Fehlersuche – Brustkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
1. Keine Signale oder schwache Signale	<p>1a. Kit wurde bei Transport oder Aufbewahrung hohen Temperaturen ausgesetzt</p> <p>1b. Funktionsstörung des Mikroskops            - Unangemessener Filtersatz            - Falsche Lampe            - Quecksilberdampflampe zu alt            - Verschmutzte und/oder gesprungene Sammellinsen            - Ungeeignetes Immersionsöl</p> <p>1c. Abgeschwächte Signale</p> <p>1d. Falsche Vorbehandlungsbedingungen</p> <p>1e. Verdunsten der Sondenmischung während der Hybridisierung</p>	<p>1a. Lagerungsbedingungen überprüfen. Bei Entgegennahme der Lieferung muss Trockeneis vorhanden gewesen sein. Flasche 3 muss bei <math>\leq -18^{\circ}\text{C}</math> lichtgeschützt gelagert werden. Flaschen 2A und 5 müssen bei maximal <math>2\text{--}8^{\circ}\text{C}</math> lichtgeschützt gelagert worden sein.</p> <p>1b. Mikroskop überprüfen und gewährleisten, dass die genutzten Filter für die Kit-Fluorochrome geeignet sind, dass die Quecksilberdampflampe angemessen ist und ihre Nutzungszeit nicht überschritten wurde (siehe Anhang 3). Im Zweifelsfall bitte Kontakt mit dem Mikroskop-Lieferanten aufnehmen.</p> <p>1c. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung gegenüber zu starkem Licht auf einem Minimum halten.</p> <p>1d. Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.</p> <p>1e. In der Hybridisierungskammer muss ausreichend Feuchtigkeit vorhanden sein.</p>
2. Keine grünen Signale	2a. Falsche Bedingungen bei der Stringenzwaschung	Für den Waschschritt mit Stringenzwaschpuffer muss die korrekte Temperatur und Zeit genutzt werden und vor diesem Waschschritt müssen die Deckgläser entfernt werden.
3. Keine roten Signale	3a. Falsche Vorbehandlungsbedingungen	Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.
4. Bereiche ohne Signal	4a. Zu geringes Sondenvolumen	Das Sondenvolumen muss zum Abdecken des Bereichs unter dem Deckglas ausreichen.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	4b. Einschluss von Luftblasen während des Auftragens der Sondenmischung oder beim Aufziehen	4b. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Falls vorhanden, vorsichtig mit Pinzette wegklopfen.
5. Übermäßige Hintergrundanfärbung	5a. Falsche Gewebefixierung  5b. Paraffin nicht vollständig entfernt  5c. Zu niedrige Temperatur der Stringenzwasch-Lösung  5d. Hybridisierter Schnitt war zu lange hellem Licht ausgesetzt.	5a. Es dürfen nur formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte verarbeitet werden.  5b. Die Verfahren für Entparaffinierung und Rehydrierung in Abschnitt B.2 durchführen.  5c. Die Temperatur der Stringenzwasch-Lösung muss 63 ( $\pm 2$ ) °C betragen.  5d. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung gegenüber zu starkem Licht auf einem Minimum halten.
6. Schlechte Gewebemorphologie	6a. Falsche Pepsin-Behandlung  6b. Falsche Vorbehandlungsbedingungen können zu unklarem oder getrübtem Aussehen führen  6c. Zu lange Pepsin-Behandlung oder sehr dünne Schnitte können zum Auftreten von Schatten- oder bikonkaven „Doughnut“-Zellen führen.	6a. Die empfohlenen Pepsin-Inkubationszeiten befolgen. Siehe Abschnitt B.3, Schritt 2. Pepsin muss bei der korrekten Temperatur gehandhabt werden. Siehe Abschnitt B.1  6b. Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.  6c. Inkubationszeit mit Pepsin verkürzen. Siehe Abschnitt B.3, Schritt 2. Die Schnittstärke muss 4–6 µm betragen.
7. Stark grüne Autofluoreszenz auf den Objektträgern einschließlich Bereiche ohne FFPE-Gewebe	7. Verwendung abgelaufener oder nicht empfohlener Glasobjektträger.	7. Gewährleisten, dass die beschichteten Glasobjektträger (Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger) das Verfallsdatum noch nicht überschritten haben.

**HINWEIS:** Falls das Problem keiner der oben genannten Ursachen zugewiesen werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

## Anhang 1 – Brustkrebs

### HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731

#### Protokoll-Checkliste

Datum des Färbelaufs:

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Charge:

Proben-ID:

Geräte-ID:

Logbuch-ID des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Datum des Ansetzens / Verfallsdatum des 1 x Waschpuffers (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Fixierung des Gewebes in neutralem gepuffertem Formalin	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
---	-----------------------------	-------------------------------

<b>Schritt 1: Vorbehandlung</b>	
Datum des Ansetzens / Verfallsdatum der Vorbehandlungslösung (Flasche 1, Verdünnung 1 : 20)	
Gemessene Temperatur der Vorbehandlungslösung (95–99 °C), falls im Wasserbad erhitzt wird	°C
Vorbehandlung (10 Minuten) und Abkühlen (15 Minuten)	
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	
<b>Schritt 2: Pepsin</b>	
Dauer der Behandlung mit Pepsin (Behälter 2A) bei 37 °C oder	Minuten
Dauer der Behandlung mit Pepsin (Behälter 2A) bei Raumtemperatur (20–25 °C) oder	Minuten
Dauer der Pepsin-Eintauchung bei 37 (±2) °C	Minuten
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	
Dehydrieren der Objektträger (3 x 2 Minuten) in abgestufter Reihe von Ethanol-Bädern und Lufttrocknung	
<b>Schritt 3: HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung</b>	
Auftrag der Sondenmischung (Flasche 3), Eindecken und Versiegeln mit Deckglas-Abdichtmittel	
Gemessene Denaturierungstemperatur (66 (±1) °C)	°C
Denaturierung über einen Zeitraum von 10 Minuten	
Gemessene Hybridisierungstemperatur (45 (±2) °C)	°C
Hybridisierungszeit (60–120 Minuten)	Minuten
<b>Schritt 4: Waschen mit Stringenzwaschpuffer</b>	
Datum des Ansetzens / Verfallsdatum des Stringenzwaschpuffers (Flasche 4, Verdünnung 1 : 20)	/
Gemessene Temperatur des Stringenzwaschpuffers (63 (±2) °C)	°C
Waschen mit Stringenzwaschpuffer (10 Minuten) nach Entfernen der Deckgläser	
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	°C
Dehydrieren der Objektträger (3 x 2 Minuten) in abgestufter Reihe von Ethanol-Bädern und Lufttrocknung	Minuten

**Schritt 5: Fixierung**

15 µL Fluoreszenz-Eindeckmedium (Flasche 5) aufbringen und eindecken	
---	--

Anmerkungen: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift Laborant/in: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anhang 2 – Brustkrebs

### HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731

#### Bewertungsschema

Logbuch-ID des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Datum des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Charge: \_\_\_\_\_ Proben-ID: \_\_\_\_\_

Signale von 20 Zellkernen auszählen					
Zellkern-Nr.	HER2-Wert (rot)	CEN-17-Wert (grün)	Zellkern-Nr.	HER2-Wert (rot)	CEN-17-Wert (grün)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
<b>Gesamt (1–10)</b>			<b>Gesamt (11–20)</b>		

Zur Bestimmung des HER2/CEN-17-Verhältnisses wird bei diesen 20 Zellkernen die Anzahl der HER2-Signale und die Anzahl der CEN-17-Signale gezählt, danach die Gesamtzahl der HER2-Signale durch die Gesamtzahl der CEN-17-Signale dividiert. Liegt das HER2/CEN-17-Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8–2,2), werden 20 weitere Zellkerne ausgezählt und das Verhältnis erneut berechnet.

Ergebnisse am oder im Bereich vom Cut-off-Wert (1,8–2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren (siehe Leitfaden für die Signalzählung).

	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17-Verhältnis
<b>Gesamtwert (1–20)</b>			

Verhältnis <2: HER2-Genamplifikation wurde nicht beobachtet

Verhältnis ≥ 2: HER2-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in: \_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin: \_\_\_\_\_

*Leitlinien für die Punktvergabe: siehe „Auswertung der Färbeergebnisse“.*

## Anhang 3 – Brustkrebs

### **HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731**

#### **Technische Daten des Fluoreszenzmikroskops**

Dako empfiehlt für die Verwendung zusammen mit dem **HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5331**, die folgenden Ausstattungen:

#### **1. Mikroskopotyp**

- Epifluoreszenzmikroskop.

#### **2. Lampe**

- Quecksilberdampflampe, 100 Watt (es sind Aufzeichnungen über die Einschaltzeit zu führen).

#### **3. Objektive**

- Für ein Screening des Gewebes: Frontoptik für trockene Betrachtung, 10X-Objektiv, oder Frontoptik für Ölimmersion, 16X-Objektiv.
- Für hochauflösende Vergrößerung und für die Punktbewertung der Signale werden nur Frontlinsen für Ölimmersion, z. B. 100X, empfohlen.

#### **4. Filter**

Für bestimmte Fluorochrome sind individuelle Filter entwickelt worden, die dementsprechend auszuwählen sind. Dako empfiehlt die Verwendung eines spezifischen DAPI-Filters in Kombination mit einem qualitativ hochwertigen Texas Red-/FITC-Doppelfilter.

- DAPI-Filter
- Texas Red/FITC-Doppelfilter
- Texas Red- und FITC-Einzelfilter können für die Bestätigung genutzt werden.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filter sind für jeden Mikroskopotyp spezifisch, und die Verwendung geeigneter Filter ist für die Auswertung von Bedeutung. Ausführlichere Informationen können vom Hersteller des Mikroskops oder vom zuständigen Dako-Mitarbeiter eingeholt werden.

#### **5. Öl**

- Nicht fluoreszierendes Öl.

#### **Vorsichtsmaßnahmen**

- Eine Quecksilberdampflampe von 50 Watt wird nicht empfohlen.
- Rhodamin-Filter können nicht verwendet werden.
- Dreifachfilter werden nicht empfohlen.

Beim Ablesen der fluoreszierenden Signale mit einem nicht optimierten Mikroskop können Probleme auftreten. Große Bedeutung kommt der Tatsache zu, dass die Lichtquelle nicht ihren Nutzbarkeitszeitraum überschritten hat und korrekt ausgerichtet und fokussiert wurde.

Hinsichtlich der Quecksilberdampflampe ist die Leistungsüberprüfung nach den Herstelleranleitungen durchzuführen. Vor einer Interpretation der Ergebnisse muss das Mikroskop gewartet und die korrekte Ausrichtung der Quecksilberdampflampe gewährleistet werden.

Damit eine Abschwächung der Fluoreszenz vermieden wird, ist zu gewährleisten, dass die Probe so wenig Anregungslicht als möglich ausgesetzt wird.

Vor dem ersten Durchführen des FISH-Verfahrens wird empfohlen, das Einrichten des im Labor genutzten Mikroskops mit dem Hersteller zu besprechen oder auf die Literatur Bezug zu nehmen.

## Zusammenfassung und Erläuterung – Magenkarzinom

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

Bei einer großen Anzahl von Studien wurde eine Überexpression des *HER2*-Proteins und Amplifikation des *HER2*-Gens bei Magenkrebs nachgewiesen (Übersicht in (20)). *HER2*-Positivität kann entweder durch das IHC- oder das FISH-Verfahren bei etwa 20 % der Patienten nachgewiesen werden (20). Vorklinische In-vitro- und In-vivo-Studien haben erwiesen, dass Trastuzumab (Herceptin™) bei verschiedenen Magenkrebsmodellen wirksam ist, was zur Einleitung klinischer Studien geführt hat (20-24). In einer Phase-III-Studie BO18255, der ToGA-Studie, wurden *HER2*-positive Patienten mit inoperablem lokal fortgeschrittenem, rezidivierendem und/oder metastasierendem Adenokarzinom des Magens bzw. gastroösophagealen Übergangs randomisiert, und ihnen wurde 5-FU oder Capecitabin und Cisplatin entweder allein oder in Verbindung mit Trastuzumab verabreicht. Bei den Patienten, die die kombinierte Behandlung aus Trastuzumab und Chemotherapie erhalten haben, wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des Gesamt-Überlebens (OS) festgestellt (25). Trastuzumab ist ein „humanisierter“ monoklonaler Antikörper, der sich mit hoher Affinität an das *HER2*-Protein bindet und die Proliferation von menschlichen, das *HER2*-Protein überexprimierenden Tumorzellen nachweislich in vitro und in vivo hemmt (21-24).

## Prinzip des Testverfahrens – Magenkarzinom

Im *HER2* IQFISH pharmDx sind alle Hauptreagenzien enthalten, die zur Durchführung eines FISH-Verfahrens an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeabschnitten benötigt werden.

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung werden Proben in Vorbehandlungslösung erwärmt. Der nächste Schritt dient der proteolytischen Andauung mit Pepsin. Nach den Vorbehandlungsschritten des Erwärmens und der proteolytischen Vorbehandlung nutzt dieses Kit einen nicht toxischen gebrauchsfertigen „IQISH Probe Mix“ (Sondenmischung), basierend auf einer Kombination aus PNA-(Peptid-Nukleinsäure; peptide nucleic acid)- (12) und DNA-Technologie. Diese Sondenmischung besteht aus einer Mischung von mit Texas Red markierten DNA-Sonden, die eine Region von 218 kb – einschließlich des *HER2*-Gens auf Chromosom 17 – abdecken und einer Mischung aus Fluorescein-markierten PNA-Sonden, die auf die Zentromer-Region von Chromosom 17 (CEN-17) abzielen. Die spezifische Hybridisierung der beiden Zielbereiche bewirkt die Bildung eines deutlichen roten Fluoreszenzsignals an jedem *HER2*-Genlokus und eines deutlichen grünen Fluoreszenzsignals an jedem der Zentromere von Chromosom 17. Nach dem Stringenzwaschschritt werden die Proben mit DAPI-haltigem Fluoreszenz-Eindeckmedium auf Objektträgern aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Mit einem mit den angemessenen Filtern (siehe Anhang 3) versehenen Fluoreszenzmikroskop werden die Tumorzellen lokalisiert und es erfolgt eine Auszählung der roten (*HER2*) und grünen (CEN-17) Signale. Daraufhin wird das *HER2*/CEN-17-Verhältnis berechnet. Im untersuchten Gewebeabschnitt vorliegende normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle der Effizienz der Vorbehandlung und Hybridisierung. Weitere Einzelheiten finden sich im Abschnitt über die Auswertung der Färbeergebnisse.

Für das interaktive e-Learning verwenden Sie bitte das *HER2* IQFISH pharmDx e-Learning-Programm, das Labortechnikern, Pathologen und Wissenschaftlern akkurat und schnell Kenntnisse vermittelt, wie sie mit dem *HER2* IQFISH pharmDx optimale Ergebnisse erzielen: [www.agilent.com](http://www.agilent.com)

## Reagenzien – Magenkarzinom

### Mitgelieferte Materialien

Die unten angeführten Kitmaterialien reichen für 20 Tests aus (Definition eines Tests: Zielbereich von 22 mm x 22 mm). Die Anzahl der Tests ergibt sich aus der Verwendung von 250 µL pro Objektträger aus Flasche 2 (5–8 Tropfen), 10 µL pro Objektträger aus Flasche 3 und 15 µL pro Objektträger aus Flasche 5. Die Lösungen aus Flasche 3 und Flasche 5 sind zähflüssig und müssen u.U. kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugiert werden, um das gesamte gelieferte Reagenz zu gewinnen.

Das Kit enthält Materialien, die für 10 einzelne Färbedurchläufe ausreichen (vier separate Durchläufe, wenn die Pepsin-Eintauchmethode angewandt wird). HER2 IQFISH pharmDx wird auf Trockeneis geliefert. **Um sicher zu sein, dass Kitkomponenten während des Transport keinen hohen Temperaturen ausgesetzt wurden, muss bei Entgegennahme des Kits immer noch Trockeneis vorhanden sein.** Hinweis: Einige Kit-Komponenten können nicht tiefgefroren sein. Dies übt keinen nachteiligen Einfluss auf die Leistung des HER2 IQFISH pharmDx aus.

#### Flasche 1

**PRE-TREATMENT SOLUTION (20x)**

#### Pre-Treatment Solution (20x)

150 mL, 20-fach konzentriert

MES-(2-[N-Morpholin]ethansulfonsäure-)Puffer.

#### Flasche 2A

**PEPSIN**

4 x 6,0 mL, gebrauchsfertig

Pepsinlösung, pH 2,0, mit Stabilisierungsmittel und antimikrobiellem Wirkstoff.

#### Flasche 2B

**PEPSIN DILUENT (10x)**

#### Pepsin Diluent (10x)

24 mL, 10-fach konzentriert

Verdünnungspuffer, pH 2,0, mit antimikrobiellem Wirkstoff.

#### Flasche 3

**HER2/CEN-17 IQISH PROBE MIX**

0,2 mL, gebrauchsfertig

Mischung aus Texas Red-markierten HER2-DNA-Sonden und Fluorescein-markierten CEN-17-PNA-Sonden in IQISH-Hybridisierungspuffer.

#### Flasche 4

**STRINGENT WASH BUFFER (20x)**

#### Stringent Wash Buffer (20x)

150 mL, 20-fach konzentriert

SSC-Puffer (saline-sodium citrate; NaCl + Natriumzitrat) mit Detergens (Tween-20).

#### Flasche 5

**FLUORESCENCE MOUNTING MEDIUM**

#### Fluorescence Mouting Medium

0,4 mL, gebrauchsfertig

Fluoreszenz-Eindeckmedium mit 500 µg/L DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol).

#### Flasche 6

**WASH BUFFER (20x)**

#### Wash Buffer (20x)

500 mL, 20-fach konzentriert

Tris/HCl-Puffer.

## COVERSILIP SEALANT

### Coverslip Sealant

1 Tube, gebrauchsfertig

Lösung für das wieder entfernbare Versiegeln von Deckgläsern.

**HINWEIS:** Folgende Kit-Reagenzien: Vorbehandlungslösung (20x), Pepsin, Pepsin-Verdünnungsmittel (10x), Stringenzwaschpuffer (20x), Fluoreszenz-Eindeckmedium, Waschpuffer (20x) und Deckglas-Abdichtmittel können durch die entsprechenden Reagenzien im Histology FISH Accessory-Kit von Dako, Code-Nr. K5799, ausgetauscht werden.

### Zusätzlich benötigte Reagenzien und Zubehör (außerhalb des Lieferumfangs)

#### Laborreagenzien

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Ethanol, 96 %

Xylol oder Xylol-Ersatz

#### Laborausstattungen/-geräte

Saugfähige Wischtücher

Einstellbare Pipetten

Kalibriertes Thermometer für die teilweise Immersion (Messbereich: 37–100 °C)

Kalibriertes Oberflächenthermometer (Messbereich: 37–100 °C)

Deckgläser (22 mm x 22 mm)

Pinzette

Abzugshaube

Heizblock oder Hybridisierungsofen\*

Feuchtigkeitskammer für die Hybridisierung\*

Mikrozentrifuge

Objektträger, Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (siehe Abschnitt zur Probenvorbereitung)

Färbeschalen oder -bäder

Kurzzeitwecker (auf Zeitabstände zwischen 2–15 Minuten ausgelegt)

Vortexer

Wasserbad mit Deckel (darauf ausgelegt, eine Temperatur von 37 ( $\pm 2$ ) °C, 63 ( $\pm 2$ ) °C und von 95 °C bis 99 °C aufrechtzuerhalten)

Mikrowellenherd mit Temperatursensor, falls Vorbehandlung mit Mikrowellenherd erfolgt (siehe B.3 Färbeprotokoll. Schritt 1: Vorbehandlung, Methode B)

\* Für Denaturierung und Hybridisierung können Geräte eingesetzt werden, die die gleichen Bedingungen wie beschrieben bieten.

#### Mikroskopausstattungen und -zubehör

Filter für das Fluoreszenzmikroskop: DAPI- und FITC/Texas Red-Doppelfilter oder FITC- und Texas Red-Monofilter – weitere Einzelheiten siehe Anhang 3.

Es wird ein Fluoreszenzmikroskop mit einer 100-Watt-Quecksilberdampflampe empfohlen. Andere Lichtquellen werden bei diesen Filtern nicht empfohlen.

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

**Vorsichtsmaßnahmen – Magenkarzinom**

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Stringent Wash Buffer (20x) ist wie folgt gekennzeichnet: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
4. Pepsin ist wie folgt gekennzeichnet:

**Gefahr**

Enthält: Reaktionsmasse von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

H314	Verursacht schwere Hautverbrennungen und Augenschäden.
H317	Kann eine allergische Hautreaktion verursachen.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P304 + P340 + P310	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P301 + P310 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen. Kein Erbrechen einleiten.
P303 + P361 + P353 + P310	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P305 + P310	BEI AUGENKONTAKT: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

5. Pepsin Diluent (10x), ist wie folgt gekennzeichnet:

**Gefahr**

Enthält: Reaktionsmasse von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündlich.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H317	Kann eine allergische Hautreaktion verursachen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Rauchen verboten.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P304 + P340 + P310	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.

P301 + P310 + P331	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen. Kein Erbrechen einleiten.
P303 + P361 + P353 + P310	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P305 + P310	BEI AUGENKONTAKT: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

6. HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix ist wie folgt gekennzeichnet:



### Achtung

Enthält: Dextran-Natriumsulfat, Ethylencarbonat

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H373	Kann bei längerer oder wiederholter Exposition Organschäden verursachen.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P260	Dämpfe nicht einatmen.
P304 + P340 + P312	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

7. Wash Buffer (20x) ist wie folgt gekennzeichnet:



### Achtung

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P264	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P305 + P351 + P338	BEI AUGENKONTAKT: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Gegebenenfalls Kontaktlinsen herausnehmen. Spülung fortsetzen.

8. Coverslip Sealant ist wie folgt gekennzeichnet:



### Gefahr

Enthält: hydoraffiniertes Naphtha (Leichtpetroleum)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündlich.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P280	Schutzhandschuhe tragen. Schutzkleidung tragen. Augen- oder Gesichtsschutz tragen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Rauchen verboten.
P241	Explosionsgeschützte elektrische Anlagen/Lüftungsanlagen/Beleuchtungsanlagen und Transportanlagen verwenden.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P304 + P340	BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P303 + P361 + P353	BEI HAUTKONTAKT (oder Kontakt mit Haaren): Sofort alle kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen.
P235	Kühl halten.
P501	Inhalt und Behälter gemäß lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

9. Sowohl vor als auch nach der Fixierung ist mit biologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu beachten (13). Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Empfindliche Bereiche nach Kontakt mit den Reagenzien mit reichlich Wasser waschen.
10. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden, da dies falsche Ergebnisse hervorrufen könnte.
11. Von den angegebenen Spezifikationen abweichende Inkubationszeiten, Temperaturen oder Methoden können zu fehlerhaften Resultaten führen.
12. Verfahren der Gewebefixierung und Schnittdicken, die von den gemachten Angaben abweichen, können die Gewebemorphologie und/oder die Signalintensität beeinträchtigen.
13. Während der Hybridisierung ein Verdunsten des *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* vermeiden, indem für ausreichende Feuchtigkeit in der Hybridisierungskammer gesorgt wird.
14. Die Reagenzien wurden zur Verwendung in diesem Test optimal verdünnt. Eine weitergehende Verdünnung kann zu einem Leistungsverlust führen.
15. Um einen Kontakt mit Augen und Haut zu vermeiden, ist angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA) zu tragen.
16. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
17. Sicherheitsdatenblätter sind auf [www.agilent.com](http://www.agilent.com) zu finden oder auf Anfrage erhältlich.
18. In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Zusätzliche Informationen bitte dem Sicherheitsdatenblatt (SDS) entnehmen.
19. Aufgrund der Heterogenität von Magenkrebssproben muss unbedingt die gesamte Probe gründlich untersucht werden, um die Signalverteilung zu bewerten, bevor der Bereich für die Auszählung festgelegt wird.
20. Die Bewertung sehr kleiner Proben wird nicht empfohlen (d.h. die Proben müssen eine intakte Morphologie und genügend Zellkerne zur Auszählung aufweisen).

- 
21. Um bei der *HER2* FISH-Analyse einer Biopsieprobe eine zuverlässige Bestimmung des *HER2*-Status zu gewährleisten, ist es erforderlich, mehrere (7-8) Biopsien aus verschiedenen Regionen des Tumors zu analysieren.
  22. Für die Ermittlung aller Gewebekerne in einer Biopsieprobe ist es wichtig, den H- und E- angefärbten Objektträger zu kontrollieren.
  23. Bei Eintauchen in Pepsin müssen saubere Färbeschalen verwendet werden (Schritt 2, Methode C).

## **Aufbewahrung – Magenkrebss**

Den *HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix* (Behälter 3) bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln aufzubewahren. Alle anderen Reagenzien können lichtgeschützt bei  $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Alle Reagenzien tolerieren Gefrierlagerung. Einfrieren und Auftauen der Reagenzien bis zu 10 Mal führt zu keiner Leistungsbeeinträchtigung.

Pepsin, *HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung* und *Fluoreszenz-Eindeckmedium* (Flaschen 2A, 3 und 5) können durch Hitzeeinwirkung beeinträchtigt werden. Diese Kitkomponenten dürfen nicht Raumtemperatur ausgesetzt werden.

*HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung* und *Fluoreszenz-Eindeckmedium* (Flaschen 3 und 5) können beeinträchtigt werden, wenn sie zu starkem Licht ausgesetzt werden. Die Lagerung dieser Komponenten oder die Durchführung des Färbeverfahrens darf nicht unter intensiver Lichteinstrahlung, wie z. B. direktem Sonnenlicht, erfolgen.

Das Kit darf nicht nach dem auf dem Außenkarton angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den in der Packungsbeilage beschriebenen aufbewahrt werden, so muss die Reagenzienleistung vom Anwender verifiziert werden (14).

Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Folglich ist es wichtig, dass die im untersuchten Gewebechnitt vorliegenden gesunden Zellen bewertet werden. Wenn ein unerwartetes Fluoreszenzmuster beobachtet wird, welches durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem *HER2 IQFISH pharmDx* besteht, ist bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

## Probenvorbereitung – Magenkarzinom

Adenokarzinomproben des Magens und des gastroösophagealen Übergangs aus Biopsien, Exzisionen oder Resektionen müssen so gehandhabt werden, dass die Gewebe für die FISH-Analyse erhalten bleiben. Für alle Proben sollten Standardmethoden der Gewebeverarbeitung für das immunzytochemische Anfärben genutzt werden (15). Bei der Untersuchung von Biopsieproben mit sehr wenig Gewebe müssen eine intakte Tumormorphologie und eine ausreichende Anzahl an Zellkernen für die Auszählung gegeben sein. Um eine zuverlässige Bestimmung des HER2-Status zu gewährleisten, wenn die *HER2* FISH-Analyse durchgeführt wird, ist es erforderlich, mehrere (7–8) auswertbare Biopsien aus verschiedenen Regionen des Tumors zu analysieren.

### Paraffineingebettete Schnitte

Für die Verwendung sind nur in neutralem gepuffertem Formalin konservierte und paraffineingebettete Schnitte geeignet. Von Proben sollten beispielsweise Präparatblöcke mit einer Dicke von 3 mm oder 4 mm angefertigt werden, gefolgt von 18–24 Stunden Fixierung in neutralem gepuffertem Formalin. Biopsieproben wurden in der ToGA-Studie 6–8 Stunden fixiert (Literaturhinweise zur Studie siehe (25)). Die Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgt dann in einer abgestuften Reihe von Ethanol und Xylol, gefolgt von der Infiltration mit geschmolzenem Paraffin, das auf einer Temperatur von nicht mehr als 60 °C gehalten wird. Sachgemäß fixierte und eingebettete Gewebe sind vor dem Anfertigen der histologischen Schnitte und dem Aufziehen auf Objekträgern bei kühler Lagerung (15–25 °C) unbegrenzt haltbar (15, 16). Andere Fixiermittel sind nicht geeignet.

Von den Gewebeproben werden Schnitte von 3–6 µm angefertigt.

Die für die Analyse der *HER2*-Genamplifikation wie auch für die Verifikation des Vorliegens des Tumors benötigten Objekträger werden zur gleichen Zeit vorbereitet. Es wird empfohlen, mindestens 2 Serienschnitte von Gewebeproben anzufertigen: 1 Schnitt wird zum Tumornachweis mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) angefärbt und 1 Schnitt dient der Analyse der *HER2*-Genamplifikation. Es wird empfohlen, die histologischen Schnitte auf Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objekträgern aufzuziehen. Proben sollten bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur (20–25 °C) innerhalb von 4–6 Monaten nach Anfertigen der Schnitte analysiert werden.

## GEBRAUCHSANWEISUNG – Magenkarzinom

### A. Vorbereitung der Reagenzien – Magenkarzinom

Es wird empfohlen, die folgenden Reagenzien vor der Färbung anzusetzen:

#### A.1 Vorbehandlungslösung

In Flasche 1 kann Kristallbildung auftreten, Kristalle werden sich jedoch bei Raumtemperatur auflösen. Vor Ansetzen des Reagenzes muss gewährleistet werden, dass keine Kristalle vorliegen.

Aus Flasche 1 (Vorbehandlungslösung 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchte angesetzte Lösung kann einen Monat lang bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Angesetzte Lösungen mit getrübtem Aussehen müssen entsorgt werden.

#### A.2 Stringenzwaschpuffer

Aus Flasche 4 (Stringenzwaschpuffer 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchter angesetzter Puffer kann einen Monat lang bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Angesetzter Puffer mit getrübtem Aussehen muss entsorgt werden.

## A.3 Waschpuffer

Aus Flasche 6 (Waschpuffer 20x) eine ausreichende Reagenzmenge ansetzen, indem das Konzentrat im Verhältnis von 1 : 20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnt wird. Nicht verbrauchter angesetzter Puffer kann einen Monat lang bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Angesetzter Puffer mit getrübtem Aussehen muss entsorgt werden.

## A.4 Ethanol-Reihe

Aus einer 96%igen Ethanol-Lösung 3 Gefäße mit jeweils 70%igem, 85%igem und 96%igem Ethanol ansetzen. Abgedeckte Gefäße bei Raumtemperatur oder 2-8 °C aufbewahren und für maximal 200 Objekträger verwenden. Angesetzte Lösungen mit getrübtem Aussehen müssen entsorgt werden.

## A.5 Pepsinlösung

Pepsinlösung wird nur benötigt, wenn die Pepsin-Eintauchmethode (Methode C) zur Anwendung kommt.

Pepsinlösung folgendermaßen vorbereiten:

Bei einem Behälter für sechs Objekträger 60 mL Pepsinlösung zubereiten:

48 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur (20-25 °C) in den Behälter geben.

6 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin-Verdünnungsmittel (10x) (Flasche 2B) hinzugeben.

6 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin (Flasche 2A) hinzugeben.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 (±2) °C annehmen lassen.

Bei einem Behälter für 24 Objekträger und für 240 mL Pepsinlösung:

192 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser bei Raumtemperatur (20-25 °C) in den Behälter geben.

24 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin-Verdünnungsmittel (10x) (Flasche 2B) hinzugeben.

24 mL kaltes (2-8 °C) Pepsin (Flasche 2A) hinzugeben.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 (±2) °C annehmen lassen.

Die Pepsinlösung innerhalb von 5 Stunden nach dem Aufwärmen verbrauchen.

## B. Färbeverfahren – Magenkarzinom

### B.1 Verfahrenshinweise

Vor der Verwendung sind alle diese Anleitungen durchzuarbeiten und Benutzer sollten sich mit allen Kitkomponenten vertraut machen (siehe „Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen“).

Alle Reagenzien sind vor ihrer Verwendung wie folgt auf die jeweilige Temperatur zu bringen:

**Flasche 1:** Die verdünnte Vorbehandlungslösung ist auf **95-99 °C** abzulegen, falls die Vorbehandlung in einem Wasserbad erfolgt (B3. Färbeprotokoll, Schritt 1: Vorbehandlung, Methode A). Falls ein Mikrowellenherd mit Temperatursensor für die Vorbehandlung verwendet wird (B3. Färbeprotokoll, Schritt 1: Vorbehandlung, Methode B) die verdünnte Vorbehandlungslösung ist auf Raumtemperatur 20-25 °C abzulegen.

**Flasche 2A:** Pepsin ist bei **2-8 °C** (B.3, Färbeprotokoll, Schritt 2, Methode A und B) aufzubringen und muss ständig gekühlt gehalten werden.

**Flasche 2B:** Pepsin-Verdünnungsmittel (10x) ist bei **2-8 °C** (B.3 Färbeprotokoll, Schritt 2, Methode C) aufzubringen.

**Flasche 3:** HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix trennt sich bei Lagerung bei ≤ -18 °C in zwei Phasen. Vor der Verwendung von Behälter 3 sicherstellen, dass nur eine Phase vorhanden ist, indem der Sondenmix auf Raumtemperatur (**20-25 °C**) gebracht und anschließend gemischt wird. Behälter 3 bei Raumtemperatur (20-25 °C) max. 30 Minuten lang auftauen (vor starker Lichteinwirkung schützen), dann den Behälter 15 Sekunden lang bei 2500 U/min mit einem

Vortex-Mischer gründlich vortexen. Behälter 3 sofort nach der Verwendung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

**Flasche 4:** Verdünnter Stringenzwaschpuffer – ein Gefäß sollte vor Verwendung auf Raumtemperatur und ein Gefäß auf **63 ( $\pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$**  gebracht werden.

**Flasche 5:** Fluoreszenz-Eindeckmedium kann bei jeder beliebigen Temperatur zwischen **2  $^{\circ}\text{C}$**  und **25  $^{\circ}\text{C}$**  aufgebracht werden.

**Flasche 6:** Der verdünnte Waschpuffer sollte auf Raumtemperatur **20-25  $^{\circ}\text{C}$**  gebracht werden.

**Das Deckglas-Abdichtmittel** kann bei jeder beliebigen Temperatur zwischen **2  $^{\circ}\text{C}$**  und **25  $^{\circ}\text{C}$**  aufgebracht werden.

**Alle Schritte müssen bei den angegebenen Temperaturbereichen durchgeführt werden.**

Das Verfahren schließt eine Reihe von Dehydrierungsschritten ein, an die sich das Trocknen der Gewebeschnitte anschließt. Das vollständige Trocknen der Gewebeschnitte muss gewährleistet werden, bevor mit dem nächsten Schritt fortgefahrene wird. Während weiterer Schritte des Färbeverfahrens dürfen Gewebeschnitte nicht austrocknen.

Muss das Färbeverfahren unterbrochen werden, können Objektträger nach der Entparaffinierung bis zu 1 Stunde lang bei Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) in Waschpuffer aufbewahrt werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Färbergebnisse kommt.

## B.2 Behandlung der Gewebeproben vor dem Färben

**Entparaffinierung und Rehydrierung:** Vor Durchführen der Analyse müssen Objektträger mit Gewebeschnitten zum Entfernen des Eindeckmediums entwachst und rehydriert werden. Das Paraffin muss vollständig entfernt werden. Überreste des Eindeckmediums können eine stärkere unspezifische Färbung zur Folge haben. Diesen Schritt bei Raumtemperatur ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) durchführen.

1. Die Objektträger in ein Xylolbad stellen und 5 ( $\pm 1$ ) Minuten inkubieren. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
2. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 2 ( $\pm 1$ ) Minuten lang in 96%iges Ethanol geben. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
3. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger 2 ( $\pm 1$ ) Minuten lang in 70%iges Ethanol geben. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
4. Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Objektträger mindestens 2 Minuten lang in verdünnten Waschpuffer geben (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG Abschnitt A.3). Das Färbeverfahren, wie in Abschnitt B.3, Schritt 1, Vorbehandlung, erläutert, beginnen.

Xylol- und Alkohollösungen sind nach 200 Objektträgern oder weniger zu erneuern.

Es kann Xylol-Ersatz verwendet werden.

**HINWEIS:** Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und Anweisungen wurden für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnungen der Kitreagenzien oder Abänderungen der Inkubationstemperaturen können zu fehlerhaften oder unstimmigen Ergebnissen führen. Unterschiede bei der Gewebeverarbeitung und bei den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können die Ergebnisse des Assays hinfällig machen.

## B.3 Färbeprotokoll

### Schritt 1: Vorbehandlung

Die Vorbehandlung kann entweder in einem Wasserbad erfolgen, wie unter Methode A) beschrieben, oder alternativ durch Verwendung eines Mikrowellenherds mit Temperatursensor, wie unter Methode B) beschrieben.

#### Methode A: Vorbehandlung mit Wasserbad

Färbebehältnisse, wie z. B. Coplin-Schalen, mit verdünnter Vorbehandlungslösung befüllen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.1). Verdünnte Vorbehandlungslösung enthaltende Färbeschalen in ein Wasserbad stellen. Wasserbad und Vorbehandlungslösung auf

95–99 °C erwärmen. Temperatur innerhalb der Schale mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten. Schalen mit Deckeln versehen, um eine Temperaturstabilisierung zu erreichen und um Verdunsten zu vermeiden.

Die auf Raumtemperatur gebrachten entparaffinierten Schnitte in die vorgewärmte Vorbehandlungslösung in den Färbeschalen einlegen. Temperatur erneut messen und 10 ( $\pm 1$ ) Minuten lang bei 95–99 °C inkubieren.

Gesamte Färbeschale samt Objektträger aus dem Wasserbad heben. Deckel abnehmen und die Objektträger 15 Minuten lang in der Vorbehandlungslösung bei Raumtemperatur abkühlen lassen.

Objektträger 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in eine Färbeschale mit verdünntem Waschpuffer geben (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.3).

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen.

**HINWEIS:** Die Vorbehandlungslösung ist ausschließlich für den Einmalgebrauch ausgelegt. Nicht wiederverwenden.

## Methode B: Vorbehandlung im Mikrowellenherd mit Temperatursensor

Ein Kunststoffgefäß mit verdünnter Vorbehandlungslösung füllen (Raumtemperatur 20–25 °C).

Die entparaffinierten Schnitte in Vorbehandlungslösung tauchen, das Gefäß mit einem punktierten Deckel abdecken und in den Mikrowellenherd stellen. Kochtemperatursensor auswählen und ein Programm, das nach Erreichen der Kochtemperatur 10 Minuten lang weiterläuft.\*

Nach der 10-minütigen Inkubation das Gefäß mit den Objektträgern aus dem Herd nehmen, den Deckel entfernen und 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Objektträger in ein Gefäß mit verdünntem Waschpuffer geben und 3 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) einweichen lassen. Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen.

\* Verwendung eines Mikrowellenherds mit Temperatursensor heißt, der Herd muss mit einem Sensor ausgestattet sein sowie mit einem Programm, das die Vorbehandlungslösung zunächst auf den Siedepunkt erhitzt, und danach die erforderliche Vorbehandlungstemperatur (über 95 °C) beibehält, bis die voreingestellte Restzeit (10 ( $\pm 1$ ) Minuten) abgelaufen ist. Einige Mikrowellenherdmodelle mit Temperatursensor bieten unter Umständen nicht die Möglichkeit, eine beliebige Restzeit einzustellen. Falls das Modell lediglich voreingestellte Programme bietet, ist darauf zu achten, ein Programm auszuwählen, das die erforderliche Vorbehandlungstemperatur (über 95 °C) mindestens 10 ( $\pm 1$ ) Minuten lang beibehält, und das Programm nach 10 ( $\pm 1$ ) Minuten manuell zu stoppen.

**HINWEIS:** Die Vorbehandlungslösung ist ausschließlich für den Einmalgebrauch ausgelegt. Nicht wiederverwenden.

## **Schritt 2: Pepsin, gebrauchsfertig, oder Pepsinlösung**

Die Pepsin-Inkubation kann durch direktes Aufbringen der gebrauchsfertigen Pepsintropfen auf die Objektträger bei Raumtemperatur (20–25 °C) (Methode A) oder bei 37 °C (Methode B) erfolgen.

Alternativ können die Objektträger in eine Pepsinlösung eingetaucht und bei 37 ( $\pm 2$ ) °C inkubiert werden (Methode C).

Methode A und Methode B:

Überschüssigen Puffer abklopfen. Mit einem flusenfreien Tuch (wie z. B. einem saugfähigen Labortuch oder Gazetupfer) vorsichtig rund um die Probe alle verbleibende Flüssigkeit abwischen und dafür sorgen, dass Reagenzien innerhalb des vorgeschrivenen Bereichs verbleiben.

5–8 Tropfen (250 µL) kaltes (2–8 °C) Pepsin (Flasche 2A) zum Bedecken der Probe aufbringen. Pepsin immer bei 2–8 °C lagern.

## Methode A: Pepsin, gebrauchsfertig – Inkubation bei 20–25 °C

5–15 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 5–15 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin abklopfen und Schnitte 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in verdünntem Waschpuffer einweichen lassen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.3).

Verdünnten Waschpuffer ersetzen und die Schnitte weitere 3 Minuten lang einweichen. Weiter mit Dehydrierung.

### Methode B: Pepsin, gebrauchsfertig – Inkubation bei 37 °C

Gewebe mit Pepsin bei 37 °C auf einen Heizblock geben und 3-5 Minuten inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 3–5 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin durch Abklopfen entfernen und Gewebeschnitte in verdünntem Waschpuffer 3 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) einweichen lassen.

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen. Weiter mit Dehydrierung.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte an der Luft vollständig trocknen lassen.

### Methode C: Pepsinlösung – Eintauchen der Objektträger in 37 °C warme Pepsinlösung

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für vier separate Durchläufe (60 mL Pepsinlösung, kleiner Behälter für sechs Objektträger) oder einen einzelnen Durchlauf (240 mL Pepsinlösung, großer Behälter für 24 Objektträger). Pepsinlösung, wie in Abschnitt A.5 beschrieben, vorbereiten.

Deckel auf den Behälter setzen und die Pepsinlösung im Wasserbad 37 ( $\pm 2$ ) °C annehmen lassen. Die Temperatur muss stabil bleiben. Temperatur im Behälter mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten.

Überschüssigen Waschpuffer abklopfen. Objektträger in die 37 ( $\pm 2$ ) °C warme Pepsinlösung eintauchen und 20–30 Minuten lang inkubieren. Bei den meisten Proben ist eine Inkubationszeit von 20–30 Minuten angemessen. Die optimale Inkubationszeit schwankt jedoch in Abhängigkeit von der Gewebefixierung und/oder Dicke des histologischen Schnitts und muss vom Anwender ermittelt werden.

Überschüssiges Pepsin durch Abklopfen entfernen und Gewebeschnitte in verdünntem Waschpuffer 3 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) einweichen lassen.

Waschpuffer ersetzen und Gewebeschnitte weitere 3 Minuten einweichen lassen. Weiter mit Dehydrierung.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte an der Luft vollständig trocknen lassen.

### **Schritt 3: HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung**

HER2/CEN-17 IQISH Probe Mix trennt sich bei Lagerung bei  $\leq -18$  °C in zwei Phasen. Vor Gebrauch von Behälter 3 vergewissern, dass nur eine Phase vorhanden ist, indem der Sondenmix auf Raumtemperatur (**20-25 °C**) gebracht und anschließend gemischt wird. Behälter 3 bei Raumtemperatur (20-25 °C) max. 30 Minuten lang auftauen (vor starker Lichteinwirkung schützen), dann den Behälter 15 Sekunden lang bei 2500 U/min mit einem Vortex-Mischer gründlich vortexten. Behälter 3 sofort nach der Verwendung bei  $\leq -18$  °C aufbewahren.

10 µL HER2/CEN-17 Probe Mix (Behälter 3) auf der Mitte des Gewebeschnitts aufbringen. Sofort über dem Sondenmix ein Deckglas von 22 mm x 22 mm Größe auflegen und Sondenmix sich gleichmäßig unter dem Deckglas ausbreiten lassen. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Sollten Luftblasen festgestellt werden, werden sie mit der Pinzette vorsichtig aus dem Gewebe herausgeklopft.

### **Flasche 3 sofort nach der Verwendung bei $\leq -18$ °C aufbewahren.**

Deckglas mit Coverslip Sealant absiegeln, indem das Abdichtmittel rund um die Peripherie des Deckglases aufgetragen wird. Das Coverslip Sealant das Deckglas und den Objektträger so

überlappen lassen, dass es eine Abdichtung rund um das Deckglas bildet. Das Coverslip Sealant muss den gesamten Rand des Deckglases abdecken.

Objektträger auf eine ebene Metall- oder Keramikoberfläche (Heizblock oder Block eines Hybridisierungsofens) legen, die auf 66 ( $\pm 1$ ) °C vorgeheizt wurde. Genau 10 Minuten lang denaturieren lassen.

Objektträger in eine vorgeheizte befeuchtete Hybridisierungskammer legen. Kammer mit Deckel versehen und 60-120 Minuten \* lang bei 45 ( $\pm 2$ ) °C inkubieren. Bitte beachten, dass eine Hybridisierungstemperatur von 37 °C nicht für die in diesem Kit enthaltenen Sonden geeignet ist.

\* Für Denaturierung und Hybridisierung können Geräte eingesetzt werden, die die gleichen Bedingungen wie oben beschrieben bieten.

## Schritt 4: Waschen mit Stringenzwaschpuffer

Zwei Färbebehältnisse, wie z. B. Coplin-Schalen, mit verdünntem Stringenzwaschpuffer befüllen (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt A.2). Für jede Schale wird ein Mindestvolumen von 100 mL oder von 15 mL pro Objektträger empfohlen.

Eine Färbeschale mit verdünntem Stringenzwaschpuffer bei Raumtemperatur unter einer Abzugshaube und die andere Färbeschale in ein Wasserbad stellen. Das Wasserbad mit dem verdünnten Stringenzwaschpuffer auf 63 ( $\pm 2$ ) °C erwärmen. Die Temperatur muss stabil bleiben. Schale mit Deckel versehen, um eine Temperaturstabilisierung zu erreichen und um Verdunsten zu vermeiden. Temperatur innerhalb der Schale im Wasserbad mit einem kalibrierten Thermometer messen, um die korrekte Temperatur zu gewährleisten. Der Stringenzwaschpuffer enthält ein Detergens, das bei 63 °C ein getrübtes Aussehen annehmen kann. Die Leistung wird hierdurch nicht beeinträchtigt.

Mit einer Pinzette oder behandschuhten Händen die Objektträger aus der Hybridisierungskammer nehmen. Vorsichtig Deckglas-Abdichtmittel ebenso wie das Deckglas entfernen und die Objektträger jeweils einen nach dem anderen in die Raumtemperatur aufweisende Schale für den Vorwaschschritt geben.

Sobald alle Deckel entfernt worden sind, die Objektträger wieder aus der Vorwaschsöhle mit der raumwarmen Lösung herausnehmen und in die 63 ( $\pm 2$ ) °C warme Schale im Wasserbad legen.

Sofort nach Übertragen der Objektträger in die 63 ( $\pm 2$ ) °C warme Schale im Wasserbad ist der Kurzzeitwecker zu starten. Das Waschen in Stringenzwaschpuffer genau 10 Minuten lang durchführen.

Objektträger aus dem verdünnten Stringenzwaschpuffer herausheben und Schnitte 3 Minuten lang bei Raumtemperatur (20–25 °C) in verdünntem Waschpuffer einweichen.

Verdünnten Waschpuffer ersetzen und Schnitte 3 weitere Minuten lang einweichen.

In einer abgestuften Reihe von Ethanol-Bädern die Gewebeschnitte dehydrieren: 2 Minuten in 70%igem Ethanol, 2 Minuten in 85%igem Ethanol und 2 Minuten in 96%igem Ethanol.

Gewebeschnitte vollständig trocknen lassen.

## Schritt 5: Fixierung

Auf dem Zielbereich des Objektträgers 15 µL Fluoreszenz-Eindeckmedium mit DAPI (Flasche 5) aufbringen und mit einem Deckglas eindecken.

**HINWEIS:** Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger kann nach 15 Minuten oder innerhalb von 7 Tagen nach dem Präparateinschluss erfolgen. Es kommt allerdings zu Verblüssen, falls die Objektträger Licht oder hohen Temperaturen ausgesetzt werden. Um ein Verblussen auf dem Minimum zu halten, sind die Objektträger bei -18 °C bis 8 °C im Dunkeln aufzubewahren.

## Qualitätskontrolle – Magenkarzinom

1. Signale müssen hell, deutlich und leicht zu bewerten sein.
2. Normale Zellen dienen als interne Positivkontrolle für den Färbungsdurchgang.
  - Normale Zellen müssen 1–2 deutlich sichtbare, grüne Signale aufweisen, ein Anzeichen dafür, dass die CEN-17-PNA-Sonde erfolgreich an die Zentromerregion von Chromosom 17 hybridisiert wurde.
  - Gesunde Zellen sollten außerdem 1–2 deutlich sichtbare rote Signale erbringen und darauf hinweisen, dass die HER2-DNA-Sonde erfolgreich an das HER2-Amplikon angelagert hat.
  - Durch das Schneiden des Gewebes weisen einige der normalen Zellen weniger als die erwarteten 2 Signale der einzelnen Farben auf.
  - Das Ausbleiben von Signalen in normalen Zellen zeigt das Versagen des Assays an, die Ergebnisse sind für ungültig zu erklären.
3. Bei der Bewertung mit einem DAPI-Filter muss die Zellkernmorphologie intakt sein. Zahlreiche Schattenzellen und eine insgesamt schlechte Zellkernmorphologie sind Anzeichen für eine zu starke Andauung der Probe, die zum Signalverlust bzw. zur Signalfragmentierung führen kann. Solche Proben müssen als ungültig angesehen werden.
4. Die Mindestanzahl bewertbarer Tumorzellen beträgt 20.
5. Unterschiede bei der Gewebefixierung und -eindeckung im Labor des Anwenders können Variationen der Resultate hervorrufen und eine regelmäßige Evaluation der laborinternen Kontrollen erforderlich machen.

## Auswertung der Färbeergebnisse – Magenkarzinom

### Bewertbares Gewebe

Den Tumor innerhalb des Kontextes des mit dem HE-Verfahren angefärbten Objektträgers lokalisieren und den gleichen Bereich auf dem mit dem FISH-Verfahren verarbeiteten Objektträger (im DAPI-Filter) bewerten. Es sollten nur Proben von Patienten mit Adenokarzinom des Magens einschließlich des gastroösophagelaen Übergangs ausgewertet werden. In Fällen mit intestinaler Metaplasie und Adenokarzinom in derselben Probe sollte nur die Karzinomkomponente ausgewertet werden. Stark entzündete und nekrotische Bereiche sowie Bereiche, in denen die nukleären Säume mehrdeutig sind, sind zu vermeiden. Es dürfen keine Zellkerne einbezogen werden, bei denen eine subjektive Bewertung vorgenommen werden muss. Kerne mit schwacher Signalintensität und nicht spezifischer Hintergrundanfärbung dürfen nicht einbezogen werden.

Zu Beginn den gesamten mit dem FISH-Verfahren angefärbten Objektträger und den auf dem HE-Gewebeschnitt bestimmten Bereich mikroskopisch untersuchen. Vor der Auszählung eines mit dem FISH-Verfahren angefärbten Objektträgers die Gesamt-Signalverteilung (homogen oder heterogen) auf dem Auszählungsblatt notieren. Bei einer heterogenen Verteilung darauf achten, ob eine fokale Amplifikation oder eine Einzel-Zell-Amplifikation (mosaikartig) vorliegt.

#### 1) Homogene Signalverteilung

Bei homogener Signalverteilung ermitteln Sie jeweils die Anzahl der Centromere der Chromosomen (grüne Signale) und die Anzahl der HER2-Gene (rote Signale) von 20 Zellen in 1-2 repräsentativen Tumorbereichen.

#### 2) Heterogene Signalverteilung

Bei heterogener Signalverteilung werden insgesamt 20 Zellen aus ausgewählten Bereichen ausgezählt, wie im Folgenden beschrieben:

A) Bei Vorliegen einer fokalen Amplifikation müssen Bereiche mit amplifizierten Zellen ausgewählt werden.

B) Bei Vorliegen einer mosaikartigen Verteilung oder amplifizierter, polysomaler und disomaler Zellen muss in Bereichen mit amplifizierten Zellen gezählt werden. In diesen Bereichen sollten nicht nur amplifizierte Zellen, sondern auch angrenzende nicht amplifizierte Zellen gezählt werden, bis die Gesamtzahl von 20 Zellen erreicht ist.

Möglichst keine überlappenden Bereiche auswählen.

## Bei diesem Schritt die Färbung bakterieller DANN vernachlässigen

Eine Reihe spezialisierter Zellen (Mastzellen und Makrophagen), die verstreut im Magengewebe vorhanden sind, weisen aufgrund des Vorhandenseins bakterieller DNA eine starke Färbung durch die HER2-Sonde auf. Das führt zu stark rot fluoreszierenden Zellen, die sich deutlich von Tumorzellen mit einer hohen HER2-Genamplifikation unterscheiden.

## Auszählung

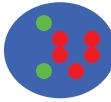
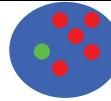
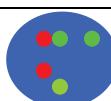
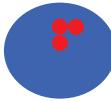
Nachdem ein Bereich für die Auszählung ausgewählt wurde, beginnen Sie bei einem der 20 ausgewählten benachbarten Zellkerne mit der Analyse und zählen dann Zelle für Zelle, wobei nur solche Zellkerne ausgelassen werden, die die Qualitätsanforderungen nicht erfüllen. Die Anzahl der Signale innerhalb des nukleären Saums jedes bewerteten Zellkerns nach den unten angeführten Leitlinien auszählen (siehe auch Anhang 7).

- Auf- und abwärts fokussieren, um alle Signale im jeweiligen Zellkern ausfindig zu machen.
- Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht. Die Distanz muss mindestens so groß sein wie der Durchmesser eines Signals normaler Größe, damit zwei einzelne Signale gezählt werden können. Wenn die Distanz zwischen zwei Signalen geringer ist als der Durchmesser eines Signals, müssen diese als ein Signal gezählt werden.
- In Zellkernen mit hoher HER2-Genamplifikation können die HER2-Signale sehr nah beieinander liegen und einen Cluster von Signalen bilden. In diesen Fällen kann die Anzahl der HER2-Signale nicht gezählt, sondern muss geschätzt werden. Besondere Aufmerksamkeit muss den grünen Signalen gewidmet werden, da Cluster von roten HER2-Signalen die grünen Signale verdecken können, sodass sie nicht sichtbar sind. Im Zweifelsfall sind die grünen Signale mithilfe eines spezifischen FITC-Filters zu kontrollieren.

Zellkerne ohne Signale oder mit nur einer Farbe aufweisenden Signalen dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden. Nur solche Zellkerne bewerten, die ein oder mehrere FISH-Signale jeder Farbe zeigen.

## Leitfaden für die Signalzählung

1		Nicht in die Zählung aufnehmen. Zellkerne überschneiden sich, es sind nicht alle Bereiche des Zellkerns sichtbar.
2		Zwei grüne Signale; Zellkerne mit nur einer Signalfarbe dürfen nicht in die Zählung einbezogen werden.
3		Als 3 grüne und 12 rote Signale zählen (Cluster-Schätzung).
4		Als 1 grünes und 1 rotes Signal zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
5	 oder 	Nicht in die Zählung aufnehmen (übermäßige oder zu geringe Andauung der Zellkerne). Fehlende Signale in der Mitte der Kerne (ringförmige Zellkerne).

6		Als 2 grüne und 3 rote Signale zählen. Als nur ein Signal werden zwei Signale gewertet, die die gleiche Größe aufweisen und durch eine Distanz voneinander getrennt sind, die dem Durchmesser des Signals entspricht oder weniger als diesen ausmacht.
7		Als 1 grünes Signal und 5 rote Signale zählen.
8		Als 3 grüne (1 grünes Signal nicht im Fokus) und 3 rote Signale zählen.
9		Cluster roter Signale kaschieren grüne Signale. Grüne Signale mit einem spezifischen FITC-Filter überprüfen oder nicht in die Zählung aufnehmen.

Zählungen, wie in Anhang 5 und 6 verdeutlicht, in einer Tabelle aufzeichnen.

Pro Gewebeprobe werden 20 Zellkerne ausgezählt, und zwar wo möglich von deutlich erkennbaren Tumorbereichen.

Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis wie folgt berechnen: Dividieren der Gesamtzahl roter *HER2*-Signale durch die Gesamtzahl grüner CEN-17-Signale.

Für Proben mit einem *HER2/CEN-17*-Verhältnis über oder gleich 2 ist die Amplifikation des *HER2*-Gens anzunehmen (26).

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Werts (1,8–2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren.

Liegt das Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8–2,2), sind 40 weitere Zellkerne auszuzählen, und das Verhältnis wird auf der Basis von 40 Zellkernen berechnet. Liegt die Auszählung weiterhin im grenzwertigen Bereich, gilt das Ergebnis der zweiten Bewertung. Für eine bessere Orientierung während der zweiten Auszählung sollte, falls verfügbar, eine *HER2*-immunhistochemische Färbung einbezogen werden.

Im Zweifelsfall ist eine erneute Bewertung des Objektträgers vorzunehmen. Bei Grenzfällen sollte eine Beratung zwischen dem Pathologen und dem behandelnden Arzt stattfinden.

## Einschränkungen – Magenkarzinom

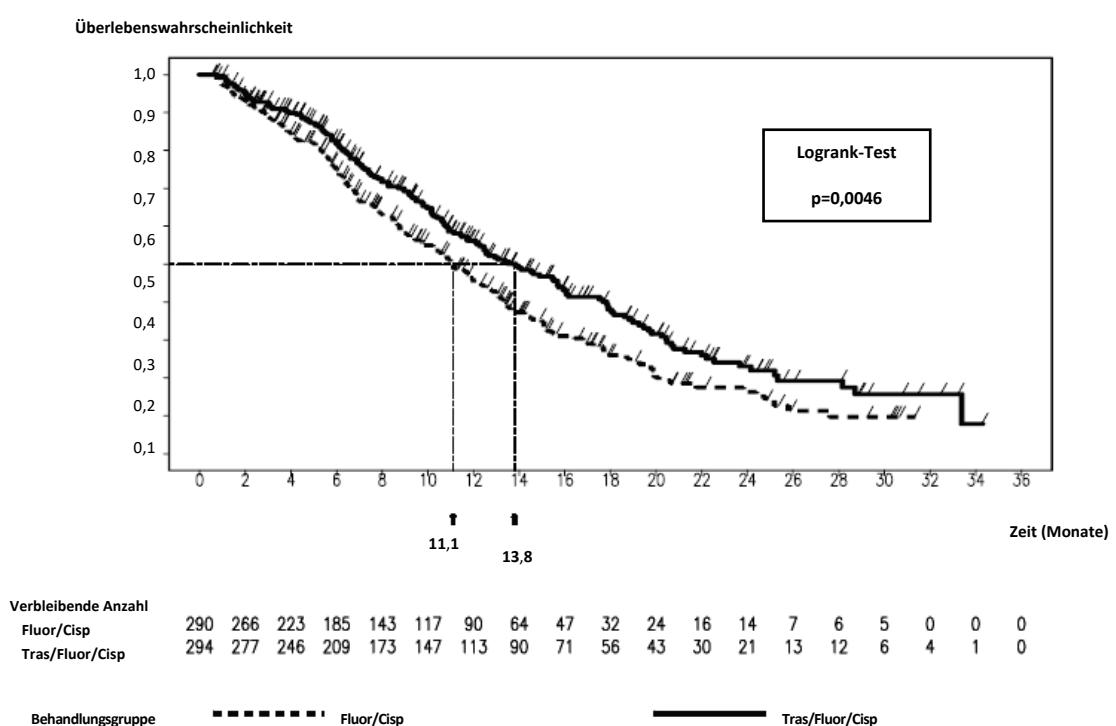
1. FISH ist ein zahlreiche Schritte umfassendes Verfahren, das hinsichtlich der Auswahl der geeigneten Reagenzien sowie der Auswahl, Fixierung und Verarbeitung von Geweben sowie der Vorbereitung des FISH-Objektträgers und der Auswertung der Färbungsergebnisse spezielle Schulung erfordert.
2. Mit dem FISH-Verfahren erhaltene Resultate sind von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färbeschritt abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, falsches Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten können die Sondenhybridisierung beeinflussen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Eideckmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.
3. Die auf Objektträger aufgezogenen Gewebe müssen für optimale und reproduzierbare Ergebnisse vollständig entparaffiniert werden. Diese Paraffinentfernung muss zu Beginn des gesamten Färbeverfahrens abgeschlossen worden sein (siehe GEBRAUCHSANWEISUNG, Abschnitt B.2).
4. Es sind ausschließlich Wasserbäder, Heizblöcke und Hybridisierungsöfen mit geeichten Einrichtungen für die Temperaturregelung zu verwenden. Die Verwendung anderer Gerätetypen muss vom Anwender validiert werden, da es hierbei während der Hybridisierung zum Verdunsten der HER2/CEN-17 Sondenmischung kommen kann.

## Leistungsmerkmale – Magenkarzinom

### Hintergrund

Die Sicherheit und Effizienz von Trastuzumab (Herceptin™) ist in einer klinischen Studie (der ToGA-Studie) nachgewiesen worden (25). Die Studie wurde als randomisierte multizentrische Open-Label-Studie der Phase III an HER2-positiven Patienten mit inoperablem lokal fortgeschrittenem, rezidivierendem und/oder metastasierendem Adenokarzinom des Magens bzw. gastroösophagealen Übergangs durchgeführt. In der ToGA-Studie wurde ermittelt, dass die HER2-Positivität entweder IHC-positiv (3+) (HercepTest™, Dako) und/oder positiv durch das *HER2 FISH*-Verfahren ( $HER2/CEN-17 \geq 2,0$ ) (*HER2 FISH pharmDx Kit*, Dako (Code-Nr. K5331)) ist. Nachdem die Patienten in die Studie aufgenommen waren, erhielten sie randomisiert entweder Chemotherapie (5-FU oder Capecitabin und Cisplatin) oder Chemotherapie plus Trastuzumab. Diese Studie zielte auf das Gesamt-Überleben (OS) ab.

In der Studie wurden insgesamt 594 Patienten randomisiert, und 584 Patienten erhielten das Prüfmedikament und wurden in das Full Analysis Set (FAS) aufgenommen. Bezuglich des Gesamt-Überlebens erwies sich die Kombination aus Chemotherapie und Trastuzumab im Vergleich zur Chemotherapie allein als statistisch überlegen. Das mittlere Gesamt-Überleben stieg von 11,1 auf 13,8 Monate ( $p=0,0046$ ) bei einer Hazard Ratio von 0,74 (95%-KI: 0,60–0,91). Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamt-Überleben sind in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3.** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamt-Überleben (n=584).

Als die Daten vorlagen, wurden vordefinierte diagnostische Analysen des HER2-Status durchgeführt. Zwei neue HER2-Untergruppen wurden nachträglich auf der Grundlage der IHC-Bewertung definiert:

**Gruppe 1 („schwach HER2 exprimierende Gruppe“):**

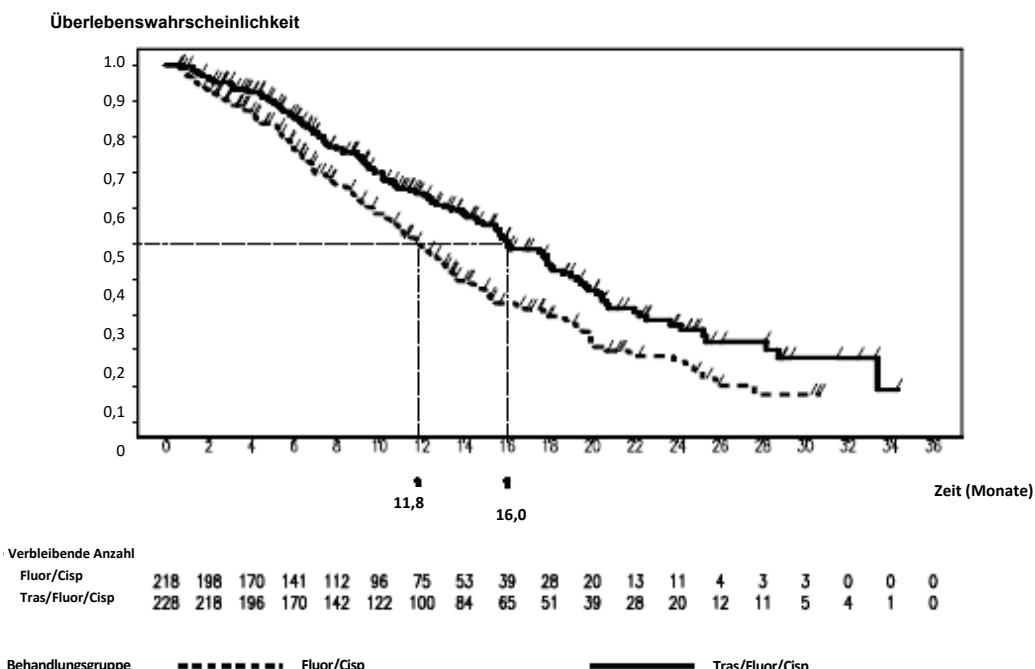
IHC 0/FISH+ und IHC 1+/FISH+ (n=131)

**Gruppe 2 („stark HER2 exprimierende Gruppe“):**

IHC 2+/FISH+ und IHC 3+ (FISH+ oder FISH - oder FISH ergebnislos) (n = 446)

Als die Primäranalyse zum Gesamt-Überleben für die „stark HER2 exprimierende Gruppe“ (n=446) nachträglich wiederholt wurde, war der Vorteil zugunsten der kombinierten

Behandlung noch stärker. Das mittlere Gesamt-Überleben bei der Patientengruppe, der Chemotherapie zusammen mit Trastuzumab verabreicht wurde, stieg auf 16,0 Monate im Vergleich zu 11,8 Monaten bei den Patienten, bei denen die Chemotherapie allein angewendet wurde. Der Hazard Ratio sank bei dieser Analyse auf 0,65 (95%-KI: 0,51–0,83). Die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamt-Überleben für die „stark HER2 exprimierende Gruppe“ sind in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4.** Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamt-Überleben für die „stark HER2 exprimierende Gruppe“ (n=446).

In der BO18255-Studie wurde der klinische Nutzen sowohl des HercepTest™ als auch des HER2 FISH pharmDx Kit zur Bestimmung des HER2-Status bei Patienten mit inoperablem, lokal fortgeschrittenem, rezidivem und/oder metastasierendem Adenokarzinom des Magens oder gastroösophagealen Übergangs nachgewiesen.

### Analytische Sensitivität

Bei der Untersuchung der analytischen Sensitivität der HER2/CEN-17 Sondenmischung wurden 18 Adenokarzinomproben des Magens verwendet. Auf der Grundlage des Auszählens von 20 Zellkernen von normalen Zellen um den Tumor herum wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl von HER2-Signalen und CEN-17-Signalen berechnet. Das HER2/CEN-17-Verhältnis bei den 18 Magen-Adenokarzinom-Proben lag zwischen 0,95 und 1,06.

### Analytische Spezifität

Zur Bestätigung einer Gesamtabdeckung von 218 kb einschließlich des HER2-Gens wurden die HER2-DNA-Sonden in der HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung einer Endsequenzierung und Kartierung unterzogen.

Die CEN-17-PNA-Sonden in der HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung wurden einzeln und in Kombination miteinander getestet, um ihre spezifische Hybridisierung der Zentromerregion von Chromosom 17 zu bestätigen.

Um die Eigenschaft des Tests zu bestimmen, allein die Zielsubstanzen HER2 und CEN-17 ohne Störung durch andere Substanzen zu identifizieren, wurden Untersuchungen an Gewebeproben vom Adenokarzinom des Magens mit Hilfe von Flasche 3 mit Hybridisierungspuffer, aber ohne Sondenmischung durchgeführt. Insgesamt 18 Proben wurden auf das Vorliegen von Signalen hin bewertet, die nicht mit der Sondenmischung in Zusammenhang standen. In keiner der 18 Proben

wurden andere Chromosomen-Zielbereiche entdeckt oder Störungen mit nah verwandten Substanzen beobachtet.

## Studien zur Robustheit

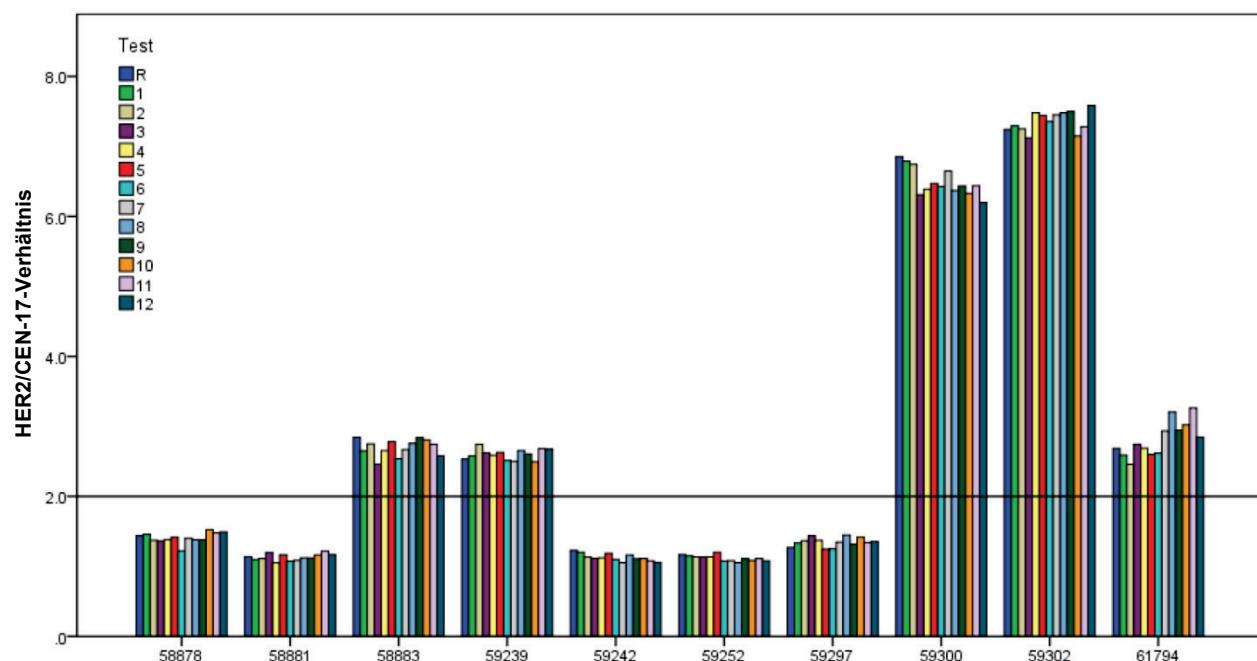
Die Robustheit des *HER2* IQFISH pharmDx Assays wurde geprüft, indem Vorbehandlungszeit, Temperatur und Methoden des Erhitzen des Vorbehandlungspuffers (Mikrowellenherd oder Wasserbad), Pepsin-Inkubationszeit und -Methode (gebrauchsfertiges Pepsin oder Eintauchen), Denaturierungszeit und -temperatur, Hybridisierungszeit und Stringenzwaschzeit und -temperatur geändert wurden.

Unter den folgenden Versuchsbedingungen wurde keine signifikante Differenz bei den Resultaten erhalten:

- Vorbehandlung Methode A) Wasserbad für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 95 °C, 95-99 °C und 99 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 95-99 °C
- Vorbehandlung Methode B) Mikrowellenherd für 9, 10 und 11 Minuten bei > 95 °C.
- Pepsin-Andauung Methode A) mit Inkubationszeiten von 5, 10 und 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C).
- Pepsin-Andauung Methode B) mit Inkubationszeiten von 3, 4 und 5 Minuten bei 37 °C.
- Pepsin-Andauung Methode C) mit Inkubationszeiten von 20, 25 und 30 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 35 °C, 37 °C und 39 °C.
- Denaturierung für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 65 °C, 66 °C und 67 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 66 °C.
- Hybridisierungszeiten 60, 90 und 120 Minuten bei 45 °C.
- Stringenzwaschung für 10 Minuten, kombiniert mit jeder der folgenden Temperaturen: 61 °C, 63 °C und 65 °C, zusammen mit 9, 10 und 11 Minuten bei 63 °C.

**Hinweis:** Bei den Robustheitstests wurde beim Färbeverfahren jeweils nur ein Parameter geändert, während alle anderen Parameter konstant blieben. Es wird empfohlen, die im Färbeverfahren angegebene Zeit und die Temperaturen einzuhalten.

Das Färbeverfahren für *HER2* IQFISH pharmDx bietet Protokollvariablen für Erwärmungsvorbehandlung, Pepsin-Andauung und Hybridisierungszeit. Jede einzelne Kombinationsoption wurde hinsichtlich des *HER2*-Genstatus validiert. Die Validierung erfolgte für jede der 12 möglichen Kombinationsoptionen an 10 humanen FFPE-Adenokarzinomproben vom Magen und vom gastroösophagealen Übergang. Das *HER2* FISH pharmDx-Kit (K5331) wurde als Referenzmethode verwendet. Das *HER2/CEN-17*-Verhältnis für jede einzelne Probe ist in Abb. 5 dargestellt. Kreuztabulierungen zwischen den 12 Tests und der Referenzfärbung zeigten insgesamt eine Übereinstimmung im *HER2*-Genstatus von 100 % (10/10) mit unterem bzw. oberem Grenzwert für das zweiseitige 95%-Konfidenzintervall von 78,3 % bzw. 100 %. Der Kappa-Wert betrug 1,00 und der McNemars-Test ergab das Fehlen eines Bias (zweiseitiger p-Wert 1,00).



**Abb. 5.** Die einzelnen HER2/CEN-17-Verhältnisse für 10 humane gastrische Adenokarzinomproben, die mit den 12 kombinatorischen Protokollvariationen gefärbt wurden, die mit HER2 IQFISH pharmDx (Code-Nr. K5731) (Test 1-12) und der Referenz (R) des HER2 FISH pharmDx Kits (Code-Nr. K5331) möglich sind. Die horizontale Linie zeigt den Cut-off-Wert von 2,0.

### Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des HER2/CEN-17-Verhältnisses wurde mit dem HER2 IQFISH pharmDx Test mittels aufeinanderfolgender Schnitte von neun unterschiedlichen Proben vom Adenokarzinom des Magens mit entweder nicht amplifiziertem oder amplifiziertem HER2-Genstatus untersucht. Drei Schnitte von jeder Probe wurden im selben Durchlauf getestet. Der durchschnittliche Variationskoeffizient betrug 3,5 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 1 % bis 5 %) und 2,8 % für die amplifizierten Proben (Spanne 1 % bis 5 %).

Die Wiederholbarkeit bei aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten unterschiedlicher Dicke (2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm und 7 µm) vom Adenokarzinom des Magens wurde mit dem HER2 IQFISH pharmDx Kit getestet. Der durchschnittliche Variationskoeffizienz des HER2/CEN-17-Verhältnisses betrug 4,5 % (Spanne 3 % bis 6 %), d. h., er lag in derselben Spanne wie beim Gewebe gleicher Dicke und innerhalb der vordefinierten Akzeptanzkriterien.

### Reproduzierbarkeit

An 3 Chargen von HER2 IQFISH pharmDx und mit drei Untersuchern wurde der HER2 IQFISH pharmDx Assay auf die Reproduzierbarkeit Charge-zu-Charge und Untersucher-zu-Untersucher untersucht. Die Reproduzierbarkeit wurde an neun unterschiedlichen Proben vom Adenokarzinom des Magens mit nicht amplifiziertem und amplifiziertem HER2-Genstatus untersucht.

Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Reproduzierbarkeit Charge-zu-Charge betrug 3,8 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 2 % bis 7 %) und 1,8 % für die amplifizierten Proben (Spanne 1 % bis 3 %).

Der durchschnittliche Variationskoeffizient für die Reproduzierbarkeit Untersucher-zu-Untersucher betrug 4,3 % für die nicht amplifizierten Proben (Spanne 3 % bis 5 %) und 4,4 % für die amplifizierten Proben (Spanne 2 % bis 7 %). Die Proben des Adenokarzinoms des Magens bestanden zu 78,8 % aus Resektionsproben und zu 22,2 % aus Biopsien. 55,6 % der Proben wurden aus dem Magen und 44,4 % aus dem gastroösophagealen Übergang entnommen.

### Klinische Nützlichkeit

Der klinische Nutzen des Dako HER2 IQFISH pharmDx (Code-Nr. K5731) wurde in einer Vergleichsstudie mit dem Dako HER2 FISH pharmDx Kit (Code-Nr. K5331) untersucht. Die

Studie umfasste 79 Magenkarzinomproben, die aus unterschiedlichen Adenokarzinomtypen des Magens bestanden, d. h. Adenokarzinome aus dem Magen oder dem gastroösophagealen Übergang sowie Resektions- oder Biopsiematerial mit homogener oder heterogener (fokaler oder mosaikartiger) Signalverteilung. Alle Tumoren wurden mit dem Dako HercepTest™ (Code-Nr. K5207) auf ihren HER2-Proteinexpressionsstatus untersucht. Proben aus jeder der vier IHC-Bewertungsgruppen (0, 1+, 2+, 3+) wurden in der Studie analysiert. Die bei beiden Tests ermittelte Kreuztabulierung des HER2-Status ergab eine Gesamtübereinstimmung von 98,7 % bei oberen und unteren Grenzwerten des 95 %-Konfidenzintervalls von 94,2 % und 99,9 %. Der Kappa-Wert betrug 0,97 bei einem unteren und oberen Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls von 0,92 und 1,00. Der p-Wert beim McNemars-Test betrug 1,00, was auf einen fehlenden Bias zwischen den zwei Tests hinweist.

## Fehlerbehebung – Magenkrebs

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
1. Keine Signale oder schwache Signale	<p>1a. Kit wurde während Transport oder Aufbewahrung hohen Temperaturen ausgesetzt</p> <p>1b. Funktionsstörung des Mikroskops            - Unangemessener Filtersatz            - Falsche Lampe            - Quecksilberdampflampe zu alt            - Verschmutzte und/oder gesprungene Sammellinsen            - Ungeeignetes Immersionsöl</p> <p>1c. Abgeschwächte Signale</p> <p>1d. Falsche Vorbehandlungsbedingungen</p> <p>1e. Verdunsten der Sondenmischung während der Hybridisierung</p>	<p>1a. Lagerungsbedingungen überprüfen. Bei Entgegennahme der Lieferung muss Trockeneis vorhanden gewesen sein. Flasche 3 muss bei <math>\leq -18^{\circ}\text{C}</math> lichtgeschützt gelagert werden. Flaschen 2A und 5 müssen bei maximal <math>2\text{--}8^{\circ}\text{C}</math> lichtgeschützt gelagert worden sein.</p> <p>1b. Mikroskop überprüfen und gewährleisten, dass die genutzten Filter für die Kit-Fluorochrome geeignet sind, dass die Quecksilberdampflampe angemessen ist und ihre Nutzungszeit nicht überschritten wurde (siehe Anhang 7). Im Zweifelsfall bitte Kontakt mit dem Mikroskop-Lieferanten aufnehmen.</p> <p>1c. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung gegenüber zu starkem Licht auf einem Minimum halten.</p> <p>1d. Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.</p> <p>1e. In der Hybridisierungskammer muss ausreichend Feuchtigkeit vorhanden sein.</p>
2. Keine grünen Signale	2a. Falsche Bedingungen bei der Stringenzwaschung	Für den Waschschritt mit Stringenzwaschpuffer muss die korrekte Temperatur und Zeit genutzt werden und vor diesem Waschschritt müssen die Deckgläser entfernt werden.
3. Keine roten Signale	3a. Falsche Vorbehandlungsbedingungen	Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.

## Magenkarzinom

<b>Problem</b>	<b>Mögliche Ursache</b>	<b>Empfohlene Maßnahme</b>
4. Bereiche ohne Signal	4a. Zu geringes Sondenvolumen  4b. Einschluss von Luftblasen während des Auftragens der Sondenmischung oder beim Aufziehen	4a. Das Sondenvolumen muss zum Abdecken des Bereichs unter dem Deckglas ausreichen.  4b. Einschluss von Luftblasen vermeiden. Falls vorhanden, vorsichtig mit Pinzette wegklopfen.
5. Übermäßige Hintergrundanfärbung	5a. Falsche Gewebefixierung  5b. Paraffin nicht vollständig entfernt  5c. Zu niedrige Temperatur der Stringenzwasch-Lösung  5d. Hybridisierter Schnitt war zu lange hellem Licht ausgesetzt.	5a. Es dürfen nur formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte verarbeitet werden.  5b. Die Verfahren für Entparaffinierung und Rehydrierung in Abschnitt B.2 durchführen.  5c. Die Temperatur der Stringenzwasch-Lösung muss 63 ( $\pm 2$ ) °C betragen.  5d. Lange mikroskopische Untersuchung vermeiden und Aussetzung gegenüber zu starkem Licht auf einem Minimum halten.
6. Schlechte Gewebemorphologie	6a. Falsche Pepsin-Behandlung  6b. Falsche Vorbehandlungsbedingungen können zu unklarem oder getrübtem Aussehen führen  6c. Zu lange Pepsin-Behandlung oder sehr dünne Schnitte können zum Auftreten von Schatten- oder bikonkaven „Doughnut“-Zellen führen.	6a. Die empfohlenen Pepsin-Inkubationszeiten befolgen. Siehe Abschnitt B.3, Schritt 2. Pepsin muss bei der korrekten Temperatur gehandhabt werden. Siehe Abschnitt B.1  6b. Immer die empfohlene Vorbehandlungstemperatur und -zeit einhalten.  6c. Inkubationszeit mit Pepsin verkürzen. Siehe Abschnitt B.3, Schritt 2. Die Schnittstärke muss 3–6 µm betragen.
7. Stark grüne Autofluoreszenz auf den Objektträgern einschließlich Bereiche ohne FFPE-Gewebe	7. Verwendung abgelaufener oder nicht empfohlener Glasobjektträger.	7. Gewährleisten, dass die beschichteten Glasobjektträger (Dako Silanized Slides, Code-Nr. S3003, oder Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger) das Verfallsdatum noch nicht überschritten haben.

**HINWEIS:** Falls das Problem keiner der oben genannten Ursachen zugewiesen werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen.

## Anhang 4 – Magenkrebs

### HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731

#### Protokoll-Checkliste

Logbuch-ID des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Datum des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Charge: \_\_\_\_\_

Proben-ID: \_\_\_\_\_

Geräte-ID: \_\_\_\_\_

Datum des Ansetzens / Verfallsdatum des 1 x Waschpuffers (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Fixierung des Gewebes in neutralem gepuffertem Formalin	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
---	-----------------------------	-------------------------------

#### Schritt 1: Vorbehandlung

Datum des Ansetzens / Verfallsdatum der Vorbehandlungslösung (Flasche 1, Verdünnung 1 : 20)	/
Gemessene Temperatur der Vorbehandlungslösung (95–99 °C), falls im Wasserbad erhitzt wird	°C
Vorbehandlung (10 Minuten) und Abkühlen (15 Minuten)	
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	

#### Schritt 2: Pepsin

Dauer der Behandlung mit Pepsin (Behälter 2A) bei 37 °C oder	Minuten
Dauer der Behandlung mit Pepsin (Behälter 2A) bei Raumtemperatur (20-25 °C) oder	Minuten
Dauer der Pepsin-Eintauchung bei 37 (±2) °C	Minuten
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	
Dehydrieren der Objekträger (3 x 2 Minuten) in abgestufter Reihe von Ethanol-Bädern und Lufttrocknung	

#### Schritt 3: HER2/CEN-17 IQISH Sondenmischung

Auftrag der Sondenmischung (Flasche 3), Eindecken und Versiegeln mit Deckglas-Abdichtmittel	
Gemessene Denaturierungstemperatur (66 (±1) °C)	°C
Denaturierung über einen Zeitraum von 10 Minuten	
Gemessene Hybridisierungstemperatur (45 (±2) °C)	°C
Hybridisierungszeit (60–120 Minuten)	Minuten

#### Schritt 4: Waschen mit Stringenzwaschpuffer

Datum des Ansetzens / Verfallsdatum des Stringenzwaschpuffers (Flasche 4, Verdünnung 1 : 20)	/
Gemessene Temperatur des Stringenzwaschpuffers (63 (±2) °C)	°C
Waschen mit Stringenzwaschpuffer (10 Minuten) nach Entfernen der Deckgläser	
Waschen in Waschpuffer (Flasche 6, Verdünnung 1 : 20) (2 x 3 Minuten)	°C
Dehydrieren der Objekträger (3 x 2 Minuten) in abgestufter Reihe von Ethanol-Bädern und Lufttrocknung	Minuten

**Schritt 5: Fixierung**

15 µL Fluoreszenz-Eindeckmedium (Flasche 5) aufbringen und eindecken	
---	--

Anmerkungen: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift Laborant/in: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anhang 5 – Magenkrebs

### HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731

#### Bewertungsschema

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Charge: \_\_\_\_\_

Logbuch-ID des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Datum des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Proben-ID: \_\_\_\_\_

#### Charakterisierung der Signalverteilung im Gewebe:

Homogen:

Heterogen – fokal:

oder Heterogen – mosaikartig:

Signale von 20 Zellkernen auszählen					
Zellkern-Nr.	rot (HER2)	grün (CEN-17)	Zellkern-Nr.	rot (HER2)	grün (CEN-17)
1			11		
2			12		
3			13		
4			14		
5			15		
6			16		
7			17		
8			18		
9			19		
10			20		
Gesamt 1–10			Gesamt 11–20		

Zur Bestimmung des HER2/CEN-17-Verhältnisses wird bei diesen 20 Zellkernen die Anzahl der HER2-Signale und die Anzahl der CEN-17-Signale gezählt, danach die Gesamtzahl der HER2-Signale durch die Gesamtzahl der CEN-17-Signale dividiert. Liegt das HER2/CEN-17-Verhältnis im grenzwertigen Bereich (1,8–2,2), werden 40 weitere Zellkerne ausgezählt und das Verhältnis erneut berechnet (siehe Bewertungsschema für Neuauszählung).

Ergebnisse am oder nahe des Cut-off-Werts (1,8–2,2) sind mit Vorsicht zu interpretieren (siehe Leitfaden für die Signalzählung).

HER2 FISH	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17-Verhältnis
Gesamtwert (1–20)			

- Verhältnis < 2: HER2-Genamplifikation wurde nicht beobachtet
- Verhältnis ≥ 2: HER2-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in: \_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin: \_\_\_\_\_

Leitlinien für die Punktvergabe: siehe „Auswertung der Färbeergebnisse“.

## Anhang 6 – Magenkrebs

### HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731

#### Bewertungsschema für Neuauiszählung

HER2 IQFISH pharmDx, K5731 Charge: \_\_\_\_\_

Logbuch-ID des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Datum des Färbelaufs: \_\_\_\_\_

Proben-ID: \_\_\_\_\_

Signale in weiteren 40 Zellkernen (1–40)												
Zellkern-Nr.	rot HER2	grün CEN-17	Zellkern-Nr.	rot HER2	grün CEN-17	Zellkern-Nr.	rot HER2	grün CEN-17	Zellkern-Nr.	rot HER2	grün CEN-17	
1			11			21			31			
2			12			22			32			
3			13			23			33			
4			14			24			34			
5			15			25			35			
6			16			26			36			
7			17			27			37			
8			18			28			38			
9			19			29			39			
10			20			30			40			
Gesamt 1–10			Gesamt 11–20			Gesamt 21–30			Gesamt 31–40			

Zur Bestimmung des HER2/CEN-17-Verhältnisses wird bei diesen 40 Zellkernen die Anzahl der HER2-Signale und die Anzahl der CEN-17-Signale gezählt, danach die Gesamtzahl der HER2-Signale durch die Gesamtzahl der CEN-17-Signale dividiert. Den Gesamtwert der Zellkerne 1–40 in der Tabelle weiter unten angeben.

HER2 FISH	HER2	CEN-17	HER2/CEN-17-Verhältnis
Gesamtwert (1–40)			

- Verhältnis <2: HER2-Genamplifikation wurde nicht beobachtet
- Verhältnis ≥2: HER2-Genamplifikation wurde beobachtet

Datum und Unterschrift Laborant/in: \_\_\_\_\_

Datum und Unterschrift Pathologe/Pathologin: \_\_\_\_\_

Leitlinien für die Punktvergabe: siehe „Auswertung der Färbeergebnisse“.

## Anhang 7 – Magenkrebs

### **HER2 IQFISH pharmDx, Code-Nr. K5731**

#### **Technische Daten des Fluoreszenzmikroskops**

Dako empfiehlt für die Verwendung zusammen mit dem **HER2 IQFISH pharmDx, K5731**, die folgenden Ausstattungen:

#### **1. Mikroskopotyp**

- Epifluoreszenzmikroskop.

#### **2. Lampe**

- Quecksilberdampflampe, 100 Watt (es sind Aufzeichnungen über die Einschaltzeit zu führen).

#### **3. Objektive**

- Für ein Screening des Gewebes: Frontoptik für trockene Betrachtung, 10X-Objektiv, oder Frontoptik für Ölimmersion, 16X-Objektiv.
- Für hochauflösende Vergrößerung und für die Punktbewertung der Signale werden nur Frontlinsen für Ölimmersion, z. B. 100X, empfohlen.

#### **4. Filter**

Für bestimmte Fluorochrome sind individuelle Filter entwickelt worden, die dementsprechend auszuwählen sind. Dako empfiehlt die Verwendung eines spezifischen DAPI-Filters in Kombination mit einem qualitativ hochwertigen Texas Red-/FITC-Doppelfilter.

- DAPI-Filter
- Texas Red/FITC-Doppelfilter
- Texas Red- und FITC-Einzelfilter können für die Bestätigung genutzt werden.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
FITC	495 nm	520 nm
Texas Red	596 nm	615 nm

Filter sind für jeden Mikroskopotyp spezifisch, und die Verwendung geeigneter Filter ist für die Auswertung von Bedeutung. Ausführlichere Informationen können vom Hersteller des Mikroskops oder vom zuständigen Dako-Mitarbeiter eingeholt werden.

#### **5. Öl**

- Nicht fluoreszierendes Öl.

#### **Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen**

- Eine Quecksilberdampflampe von 50 Watt wird nicht empfohlen.
- Rhodamin-Filter können nicht verwendet werden.
- Dreifachfilter werden nicht empfohlen.

Beim Ablesen der fluoreszierenden Signale mit einem nicht optimierten Mikroskop können Probleme auftreten. Große Bedeutung kommt der Tatsache zu, dass die Lichtquelle nicht ihren Nutzbarkeitszeitraum überschritten hat und korrekt ausgerichtet und fokussiert wurde.

Hinsichtlich der Quecksilberdampflampe ist die Leistungsüberprüfung nach den Herstelleranleitungen durchzuführen. Vor einer Interpretation der Ergebnisse muss das Mikroskop gewartet und die korrekte Ausrichtung der Quecksilberdampflampe sichergestellt werden.

Damit eine Abschwächung der Fluoreszenz vermieden wird, ist zu gewährleisten, dass die Probe so wenig Anregungslicht als möglich ausgesetzt wird.

Vor dem ersten Durchführen der FISH-Technik wird empfohlen, das Einrichten des im Labor genutzten Mikroskops mit dem Hersteller zu diskutieren oder auf die Literatur Bezug zu nehmen.

## References/ Bibliographie/ Literatur

1. Muleris M, Almeida A, Malfoy B, Dutrillaux B. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17q21.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76(1-2):34-5.
2. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230(4730):1132-9.
3. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229(4717):974-6.
4. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(4):319-25.
5. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(12):5321-5.
6. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(1):41-8.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
8. Rennstam K, Baldetorp B, Kytola S, Tanner M, Isola J. Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res* 2001;61(3):1214-9.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50(14):4332-7.
10. Nichols DW, Wolff DJ, Self S, Metcalf JS, Jacobs D, Kneuper-Hall R, et al. A testing algorithm for determination of HER2 status in patients with breast cancer. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32(1):3-11.
11. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16(2):173-82.
12. Nielsen PE, Egholm M, editors. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. Norfolk NR18 0EH, England: Horizon Scientific Press 1999.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; Approved guideline. NCCLS document M29-A. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: NCCLS. 1997.
14. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, FR 7163, February 28. 1992.
15. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: CV Mosby Company. 1980.
16. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. New York: Pergamon Press 1981.
17. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, et al. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001;92(12):2965-74.
18. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2000;53(12):890-2.
19. Hanna W. Testing for HER2 status. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:22-30.
20. Jorgensen JT. Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology* 2010;78(1):26-33.
21. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(6):795-805.
22. Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, et al. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol* 2008;32(1):89-95.
23. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol* 2005;27(3):681-5.

24. Tanner M, Hollmen M, Junntila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005;16(2):273-8.
25. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376(9742):687-97
26. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008;52(7):797-805.





## Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	<b>LOT</b>	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum		Keep away from sunlight (consult storage section) Protéger de la lumière du soleil (voir section Stockage) Lichtgeschützt lagern (siehe Abschnitt zur Lagerung)		Use by Utiliser jusqu'à Verwendbar bis
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Ansätze		Manufacturer Fabricant Hersteller
<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft				

					GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrensymbol (siehe Abschnitt zu den Sicherheitshinweisen)
--	--	--	--	--	---



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)