

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Istruzioni per l'uso

Da utilizzare sul sistema di colorazione avanzato, completamente automatizzato Leica Biosystems' BOND.

Il Product Code TA9145 è stato concepito per colorare 60 test (150 vetrini):

60 vetrini test con HER2 Primary Antibody

60 vetrini test con HER2 Negative Control

15 vetrini di controllo HER2 con HER2 Primary Antibody

15 controlli di tessuto positivo interno con HER2 Primary Antibody



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



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

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

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

Indice

Utilizzo previsto	4
Riassunto e spiegazione	4
Contesto	4
Espressione di HER2	5
Riassunto della concordanza clinica	5
Principio di procedura	5
Componenti forniti	6
Indicazioni sull'utilizzo	6
Conservazione e stabilità	6
Preparazione dei campioni	6
Avvertenze e precauzioni	7
Procedura	8
A. Reagenti necessari ma non forniti	8
B. Attrezzature necessarie ma non fornite	8
C. Metodologia	8
D. Disposizione dei vetrini	9
E. Fasi della procedura	9
Controllo qualità	12
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	12
Tessuto di Controllo positivo interno – HER2 Primary Antibody	13
Componente del tessuto di controllo negativo interno – HER2 Negative Control.....	13
Tessuto paziente – HER2 Negative Control	13
Tessuto paziente – HER2 Primary Antibody	13
Verifica dell'analisi.....	14
Interpretazione della colorazione - Mammario	14
Interpretazione della colorazione - Gastrico	15
Razionale per l'ordine di screening dei vetrini	16
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody.....	16
2. Tessuto di controllo positivo interno – HER2 Primary Antibody	16
3. Componente del tessuto di controllo negativo interno – HER2 Positive Control	16
4. Tessuto pazienti – colorato utilizzando HER2 Negative Control.....	16
5. Tessuto pazienti – colorato utilizzando HER2 Primary Antibody	16
Limitazioni	16
A. Limitazioni generali	16
B. Limitazioni specifiche del prodotto	17
Dati della linea cellulare	18
Concordanza clinica del Bond Oracle HER2 IHC System vs. Dako HercepTest - Mammario	18
Risultati concordanza 2x2	19
Risultati concordanza 3x3	20
Clinical Concordance of Bond Oracle HER2 IHC System to PathVysion DNA HER-2 Probe Kit - Mammario	21
Risultati concordanza 3x2	21
Concordanza clinica di Bond Oracle HER2 IHC System con Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Gastrico	22
Risultati -Bond Oracle HER2 IHC System in confronto a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Gastrico	22
Risultati concordanza 2x2	22
Risultati concordanza 3x3	23
Immunoreattività – Pannello normale	24

Studio di riproducibilità	25
Test di precisione intraseduta e interseduta	25
A. Test di precisione intraseduta	25
B. Test di precisione interseduta	25
C. Riproducibilità da lotto a lotto	25
D. Riproducibilità interlaboratorio	26
E. Riproducibilità interosservatore	27
F. Precisione interstrumentale (BOND-MAX vs. BOND-III)	27
Risoluzione dei problemi	28
Bibliografia	30

Utilizzo previsto

Per uso diagnostico in vitro

Il Bond Oracle HER2 IHC System è un test immunistochemico (IHC) semi-quantitativo che serve a determinare il livello dell'oncoproteina HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) nel tessuto tumorale mammario e negli adenocarcinomi dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo) sottoposto a valutazione istologica. Il Bond Oracle HER2 IHC System è indicato come ausilio nella valutazione dei pazienti per i quali viene considerato un trattamento a base di Herceptin® (trastuzumab) (si vedano le istruzioni incluse nella confezione di Herceptin®).

Nota: tutti i pazienti dei test clinici a base di Herceptin® sono stati selezionati mediante un CTA (Clinical Trial Assay) immunocitochemico investigativo. Nessuno dei pazienti in quei test è stato selezionato utilizzando il Bond Oracle HER2 IHC System. Il Bond Oracle HER2 IHC System è stato messo a confronto con il Dako HercepTest™ su un insieme di campioni indipendenti e ha mostrato di ottenere risultati concordanti accettabili, come indicato nel riassunto della Concordanza Clinica. L'effettiva correlazione tra il Bond Oracle HER2 IHC System e il risultato clinico non è ancora stata stabilita.

Tutti i pazienti dei test clinici del carcinoma gastrico avanzato (ToGA) a base di Herceptin® sono stati selezionati mediante il Dako HercepTest. Nessuno dei pazienti in quei test è stato selezionato utilizzando il Bond Oracle HER2 IHC System. Il Bond Oracle HER2 IHC System è stato messo a confronto con il Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody su una serie di campioni indipendenti e ha fornito risultati abbastanza concordanti, come indicato nel Riassunto Concordanza Clinica (Gastrico). L'effettiva correlazione tra il Bond Oracle HER2 IHC System e il risultato clinico non è ancora stata stabilita.

Riassunto e spiegazione

Contesto

Il Bond Oracle HER2 IHC System contiene l'anticorpo monoclonale anti-HER2 del topo, clone CB11. Il clone CB11, inizialmente sviluppato da Corbett et al (1) e prodotto da Novocastra Laboratories Ltd (oggi Leica Biosystems Newcastle Ltd), è diretto contro il dominio interno dell'oncoproteina HER2.

In una percentuale di pazienti al seno e il cancro gastrico, l'HER2 oncoproteina è sovraespresso come parte del processo di trasformazione maligna e la progressione del tumore (2). Stato HER2 è stato anche dimostrato di avere importanti implicazioni per il trattamento del cancro gastrico (3). Sovraespressione di HER2 oncoproteina trova nelle cellule del cancro al seno HER2 suggerisce come bersaglio per una terapia a base di anticorpi, mentre i risultati del trial ToGA indicano chiaramente che l'uso di Herceptin nel carcinoma gastrico insieme con la chemioterapia è un trattamento efficace, che migliora la sopravvivenza globale in HER2 tumori gastrici positivi (4). Herceptin® è un anticorpo monoclonale umanizzato (5) che si lega con alta affinità per il HER2 oncoproteina e ha dimostrato di inibire la proliferazione delle cellule tumorali umane che iperesprimono HER2 oncoproteina sia in vitro che in vivo (6-8).

Dai tempi della prima tecnica di immunoperossidasi, riportata da Nakane e Pierce (9), sono stati compiuti molti progressi nel campo dell'immunistochemica che hanno portato ad una maggiore sensibilità. Un recente sviluppo ha riguardato l'uso della marcatura polimerica. Tale tecnologia è stata applicata sia agli anticorpi primari sia ai sistemi di rilevazione immunistochemica (10). Il sistema di rilevazione Compact Polymer™ utilizzato da Bond Oracle HER2 IHC System fa parte di un insieme di nuove tecnologie a polimerizzazione controllata che sono state specificamente sviluppate per preparare i coniugati polimerici degli anticorpi legati a HRP. Dal momento che la presente tecnologia polimerica viene utilizzata nella gamma dei prodotti Oracle, il problema della colorazione aspecifica della biotina endogena, che potrebbe essere riscontrato nei sistemi di rilevazione della streptavidina/biotina, non si presenta.

Espressione di HER2

L'oncoproteina HER2 viene espressa a livelli rilevabili mediante immunistochimica nel 20% degli adenocarcinomi presenti in diversi siti. Tra il 10% e il 20% dei carcinomi duttali invasivi della mammella (11) e il 20% dei tumori gastrici (12-14) sono positivi per HER2 oncoproteina. Il 90% dei casi di carcinomi duttali in situ (DCIS) di tipo comedo sono positivi (15), insieme a quasi tutti i casi di malattia di Paget della mammella (16).

Riassunto della concordanza clinica

Il Bond Oracle HER2 IHC System è stato sviluppato per fornire un'alternativa ai CTA investigativi utilizzati negli studi clinici dell'Herceptin®. Il rendimento del Bond Oracle HER2 IHC System per quanto riguarda la determinazione della sovraespressione dell'oncoproteina HER2 è stato valutato in uno studio indipendente che metteva a confronto i risultati del Bond Oracle HER2 IHC System con quelli del Dako HercepTest su 431 campioni di tumore al seno, originari degli Stati Uniti. Nessuno di questi campioni di tumori è stato ottenuto da pazienti partecipanti ai test clinici con Herceptin®. I risultati indicavano una concordanza del 92,34% in un'analisi 2x2 (intervalli di confidenza del 95% tra l'89,42% e il 94,67%) e dell'86,54% in un'analisi 3x3 (intervalli di confidenza del 95% tra l'82,95% e l'89,62%) tra i risultati delle due analisi.

Il rendimento del Bond Oracle HER2 IHC System per quanto riguarda la determinazione della sovraespressione dell'oncoproteina HER2 negli adenocarcinomi dello stomaco (incluso il giunto gastroesofageo) è stato valutato in uno studio indipendente cinese che mette a confronto i risultati del Bond Oracle HER2 IHC System con quelli del Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody su 287 campioni di tumore gastrico. Nessuno di questi campioni di tumori è stato ottenuto da pazienti partecipanti ai test clinici con Herceptin®. I risultati indicavano una concordanza del 95,12% in un'analisi 2x2 (intervalli di confidenza del 95% tra il 91,95% e il 97,31%) e dell'89,90% in un'analisi 3x3 (intervalli di confidenza del 95% tra l' 85,81% e il 93,13%) tra i risultati rispettivamente dell'analisi del Bond Oracle HER2 IHC System e il Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5).

Principio di procedura

Il Bond Oracle HER2 IHC System contiene componenti necessari per completare una procedura di colorazione immunistochimica per tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina. In seguito all'incubazione con l'HER2 Primary Antibody pronto all'uso (clone CB11), il sistema si avvale della tecnologia a polimeri compatti. La conversione enzimatica del cromogeno aggiunto successivamente comporta la formazione di un prodotto di reazione visibile nel sito antigenico. Le sezioni dei tessuti possono essere quindi controcolorate, disidratate, pulite e montate. I risultati vengono interpretati con un microscopio luminoso. Vengono forniti dei vetrini di controllo con quattro linee cellulari di tumore mammario umano fissate in formalina e incluse in paraffina per convalidare le sedute di colorazione. Le quattro linee cellulari mostrano l'espressione dell'oncoproteina HER2 alle intensità 0, 1+, 2+ e 3+. L'intensità di colorazione di queste linee cellulari è correlata sia al carico di recettori dell'oncoproteina HER2 per cellula sia alla condizione di amplificazione del gene HER2.

Il Bond Oracle HER2 IHC System (product code TA9145) è da utilizzare sul sistema di colorazione avanzato, completamente automatizzato Leica Biosystems' BOND.

Componenti forniti

I materiali sotto elencati (Tabella 1) sono sufficienti per colorare 150 vetrini (60 vetrini test incubati con HER2 Primary Antibody, 60 vetrini test corrispondenti incubati con HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides incubati con HER2 Primary Antibody e 15 controlli del tessuto positivo interno incubato con HER2 Primary Antibody). Il numero di test si basa sull'utilizzo di una dispensa automatizzata di 150 µl per vetrino. Il kit fornisce materiale sufficiente per un massimo di 15 sedute di colorazione individuale BOND.

HER2 Control Slides, (x15)	Sezioni di linee cellulari di tumore al seno umano fissate in formalina e incluse in paraffina che mostrano l'espressione dell'oncoproteina HER2 alle intensità di colorazione 0, 1+, 2+ e 3+ se colorate in base al protocollo previsto. Queste sezioni vanno pienamente rispettate e non richiedono ulteriore cottura.
HER2 Primary Antibody, 13,5 ml	Contiene l'anticorpo IgG monoclonale del topo, pronto all'uso e purificato per affinità, clone CB11 e 0,035% 2-metil-2H-isotiazol-3-one..
HER2 Negative Control, 9 ml	Contiene IgG di topo pronto all'uso ad una concentrazione equivalente all'HER2 Primary Antibody e 0,035% 2-metil-2H-isotiazol-3-one.
Peroxide Block, 22,5 ml	Contiene perossido di idrogeno al 3-4%.
Post Primary, 22,5 ml	IgG anti-topo di coniglio (<10 µg/ml) in soluzione salina tris tamponata contenente 10% (v/v) di siero animale e 0,01% 2-metil-2H-isotiazol-3-one.
Polymer, 22,5 ml	IgG anti-coniglio di capra poli-HRP (<25 µg/ml) in soluzione salina tris tamponata contenente 10% (v/v) di siero animale e 0,01% 2-metil-2H-isotiazol-3-one.
DAB Part 1, 2,25 ml	Contiene 66 mM 3,3'-diamminobenzidine tetraidrocloreuro, in una soluzione stabilizzante.
DAB Part B (x2), 22,5 ml	Contiene ≤0,1% (v/v) di perossido di idrogeno.
Hematoxylin, 22,5 ml	Contiene <0,1% di ematossilina.

Tabella 1. Component iBond Oracle HER2 IHC System

Indicazioni sull'utilizzo

Tutti i reagenti forniti sono formulati per essere utilizzati nello specifico con questa analisi e per ciascun Bond Oracle HER2 IHC System sono specifici i numeri di lotto. Per garantire la validità di questa analisi, non deve essere eseguita alcuna sostituzione.

Conservazione e stabilità

Conservare a temperature tra 2 e 8 °C. Non congelare. Riportare a 2–8 °C subito dopo l'uso. Qualsiasi discostamento da queste condizioni invaliderà l'analisi. Accertarsi che il Bond Oracle HER2 IHC System utilizzato non sia già scaduto. I segnali indicanti contaminazione e/o instabilità del Bond Oracle HER2 IHC System sono: torbidità delle soluzioni, sviluppo di odori e presenza di precipitato. Le condizioni di conservazione diverse da quelle specificate devono essere verificate dall'utilizzatore.

Preparazione dei campioni

Tutti i campioni devono essere preparati allo scopo di conservare il tessuto per la colorazione immunohistochimica. I metodi standard per l'elaborazione dei tessuti dovrebbero essere applicati a tutti i campioni (17).

Si raccomanda di preparare i tessuti in fissativi a base di formalina, di trattarli normalmente e includerli in paraffina. Ad esempio, i campioni di resezione dovrebbero essere bloccati ad uno spessore di 3–4 mm e fissati per 18–24 ore in formalina tamponata neutra al 10%. I tessuti devono quindi essere disidratati in una serie di alcoli e puliti mediante xilene, seguito da impregnazione con cera paraffinica fusa, conservata a non più di 60 °C. I campioni di tessuto vanno sezionati tra 3 e 5 µm.

I vetrini necessari per la valutazione dell'oncoproteina HER2 e la verifica dei tumori devono essere preparati nello stesso momento. Per conservare l'antigenicità, le sezioni tissutali montate sui vetrini (Leica BOND Plus Slides – codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040) andrebbero colorate entro 4–6 settimane dal sezionamento e mantenute a temperatura ambiente (18–24 °C). In seguito al sezionamento, si raccomanda l'incubazione dei vetrini per 12–18 ore (tutta la notte) a 37 °C. Le sezioni che richiedono ulteriore aderenza possono essere incubate a 60 °C per un'ulteriore ora.

Negli USA, il Clinical Laboratory Improvement Act del 1988 prevede secondo il 42 CFR 493.1259(b) che "Il laboratorio deve conservare i vetrini colorati per almeno dieci anni dalla data di esame e conservare i blocchi campione per almeno due anni dalla data di esame".

Avvertenze e precauzioni

Solo per utilizzatori professionisti.

Uno o più componenti nel prodotto sono pericolosi.

Di norma, ai minorenni non è consentito lavorare con questo prodotto. Gli utilizzatori devono essere adeguatamente istruiti sulla corretta procedura di lavorazione, sulle proprietà pericolose del prodotto e sulle necessarie disposizioni di sicurezza.

I sintomi di sovraesposizione al ProClin™ 950, il conservante utilizzato nei reagenti Oracle, possono causare irritazione alla pelle e agli occhi e irritazione alle mucose e al tratto respiratorio superiore. La concentrazione di ProClin™ 950 in questo prodotto è pari allo 0,35% massimo. Queste soluzioni non soddisfano i criteri OSHA in materia di sostanze pericolose. Un Material Safety Data Sheet è disponibile a richiesta o sul sito www.LeicaBiosystems.com.

I campioni, pre e post fissazione, e tutti i materiali ad essi esposti, vanno maneggiati come oggetti potenzialmente in grado di trasmettere infezioni e smaltiti con precauzione.

Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la pelle e le mucose. Qualora i reagenti o i campioni entrassero in contatto con aree sensibili,

lavare queste ultime con abbondante acqua. Rivolgersi ad un medico. Consultare la normativa federale, statale o locale in materia di smaltimento di componenti potenzialmente tossici. Ridurre la contaminazione microbica dei reagenti, altrimenti si potrebbe verificare un aumento della colorazione aspecifica.

Procedura

A. Reagenti necessari ma non forniti

- BOND Dewax Solution (codice prodotto AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (codice prodotto AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (codice prodotto AR9590)
- Solventi standard utilizzati in immunostochimica (ad es., etanolo, assoluto e graduato)
- Xilene (o sostituti di xilene)
- Strumento di montaggio
- Acqua distillata o deionizzata

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

- Sistema(i) di colorazione avanzata, completamente automatizzata Leica Biosystems' BOND-MAX e BOND-III
- BOND Universal Covertiles (codice prodotto S21.2001, S21.4583 o S21.4611)
- BOND Mixing Stations (codice prodotto S21.1971)
- Forno essiccante in grado di mantenere una temperatura pari a 60 °C
- Microscopio luminoso (ingrandimento obiettivo 4–40x)
- Vetrini (Leica BOND Plus Slides – codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040)
- Vetrini coprioggetti
- BOND Slide Label & Print Ribbon (codice prodotto S21.4564)
- BOND Aspiring Probe Cleaning System (codice prodotto CS9100)

C. Metodologia

- Prima di applicare questa metodologia, gli utilizzatori devono apprendere le tecniche di immunostochimica completamente automatizzate BOND.
- Ciascuna sezione test da colorare con HER2 Primary Antibody richiederà una sezione identica per la colorazione con HER2 Negative Control. La sezione di controllo negativo consente di differenziare la colorazione specifica da quella aspecifica nel sito antigenico. Ciascuna seduta di colorazione BOND dovrebbe includere un HER2 Control Slide. Al termine del protocollo di colorazione, se le linee cellulari non mostrano i modelli di colorazione corretti (si veda Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), la seduta non andrebbe considerata valida.

D. Disposizione dei vetrini

Un nuovo BOND Universal Covertile (codice prodotto S21.2001, S21.4583 o S21.4611) deve essere utilizzato per ciascun vetrino. L'utilizzo di BOND Universal Covertiles, precedentemente utilizzato per la colorazione per ibridazione in situ o immunostochimica, non è stato validato dal presente test.

La disposizione del vassoio di vetrini (Tabella 2) rende possibile la prestazione ottimale del

Bond Oracle HER2 IHC System e il raggiungimento completo dei 60 test.

Posizione del vetrino	Descrizione del vetrino	Reagente	Tipo di tessuto	Icona vetrino
1	Caso 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Caso 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Caso 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Caso 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Caso 1	*HER2PrimaryAntibody	Test	
6	Caso 2	*HER2PrimaryAntibody	Test	
7	Caso 3	*HER2PrimaryAntibody	Test	
8	Caso 4	*HER2PrimaryAntibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	
10	Controllo di tessuto interno	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	

Tabella 2. Disposizione del vassoio di vetrini che mostra il tipo di tessuto e il reagente

E. Fasi della procedura

Seguite le fasi sotto illustrate per ottenere una disposizione del vassoio di vetrini come quella descritta nella Tabella 2. Tali istruzioni vanno lette insieme al BOND System User Manual.

1. Sullo strumento BOND, accertatevi che i contenitori per rifiuti sfusi e pericolosi abbiano la capacità sufficiente per le sedute di colorazione necessarie.
2. Accertatevi che vi sia sufficiente alcol, acqua distillata o deionizzata, BOND Dewax Solution (fornito pronto all'uso), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (fornito pronto all'uso) e BOND Wash Solution (fornito come concentrato x10) nei contenitori di reagenti sfusi per eseguire le sedute di colorazione necessarie.
3. Verificate che sia stata installata una BOND Mixing Station pulita.
4. Avviate il sistema di colorazione avanzato, completamente automatizzato BOND.
5. Accendete il controllore BOND collegato al sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND.
6. Aprite il software BOND.
7. Per un nuovo Bond Oracle HER2 IHC System, scansionate il codice a barre del vassoio

- dei reagenti con lo scanner manuale per inserire il sistema nell'inventario dei reagenti BOND.
8. Andate alla schermata di impostazione Vetrino e fate clic su **Add case**.
 9. Inserite i dettagli riguardanti il primo caso. Verificate che il volume dispensato sia pari a **150 µl** e che il protocollo di preparazione sia ***Dewax**. Fate clic su OK.
 10. Con il caso evidenziato nella schermata di impostazione Vetrino, fate clic su **Add slide**.
 11. Per prima cosa, aggiungete i vetrini test del paziente. Verificate che il tipo di tessuto sia impostato come **Test tissue**.
 12. Confermate che il volume dispensato sia pari a **150 µl** e che il protocollo di preparazione sia ***Dewax**.
 13. Selezionate i valori della modalità di colorazione **Single** e **Oracle** (non fate clic su **Oracle control**).
 14. Selezionate il processo **IHC**.
 15. Selezionate ***HER2 Negative Control** dall'elenco dei marcatori. Il tab dei Protocolli si sposta automaticamente sul protocollo di colorazione corretto (***IHC Protocol H**) e sul protocollo HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**).
 16. Fate clic su **Add slide**. Il vetrino del reagente di controllo negativo viene creato.
 17. Sempre nella finestra di dialogo Add slide, selezionate ***HER2 Primary Antibody** dall'elenco dei marcatori. I protocolli di default e tutte le altre impostazioni rimangono immutate.
 18. Fate clic su **Add slide**. Il vetrino test viene creato.
 19. Ripetete le fasi dalla 8 alla 18 finché non vengono creati tutti i vetrini test dei casi e dei pazienti.
 20. Successivamente create HER2 Control Slide. Aggiungetelo all'ultimo caso o create un nuovo caso per i vetrini di controllo, a seconda delle pratiche di laboratorio da voi adottate.

Nota importante: è condizione essenziale del Bond Oracle HER2 IHC System che un HER2 Control Slide sia inserito in ogni seduta (ossia, vassoio di vetrini) per rendere valida l'analisi.
 21. Nella finestra di dialogo Add slide impostate il tipo di tessuto come **Positive tissue**.
 22. Fate clic su **Oracle control**.
 23. Selezionate il numero di lotto dell'HER2 Control Slide nell'elenco **Lot No**. Il numero di lotto viene riportato sull'etichetta del vetrino.

Nota importante: l'HER2 Control Slide deve provenire dallo stesso Bond Oracle HER2 IHC System che verrà utilizzato.
 24. Selezionate ***HER2 Primary Antibody** dall'elenco dei marcatori. Conservate il volume dispensato, la modalità di colorazione e le impostazioni relative ai processi e ai protocolli.
 25. Fate clic su **Add slide** per aggiungere l'HER2 Control Slide.
 26. Infine, aggiungete un vetrino di controllo di tessuto positivo interno.
 27. Deselezionate **Oracle control**.

28. Selezionate ***HER2 Primary Antibody** dall'elenco dei marcatori. Conservate il volume dispensato, la modalità di colorazione e le impostazioni relative ai processi e ai protocolli. Il tipo di tessuto rimane **Positive tissue**.
29. Fate clic su **Add slide**. Questo completa la creazione del vetrino.
30. Stampate le etichette del vetrino. Tutte le etichette del vetrino Oracle presentano stampata la sigla "OC". L'etichetta per l'HER2 Control Slide include inoltre il numero di lotto del Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Etichettate i vetrini in maniera corretta.
32. Aprite i coperchi di tutti i contenitori del Bond Oracle HER2 IHC System e caricate il vassoio dei reagenti nel BOND.
33. Posizionate i vetrini sul vassoio vetrini nell'ordine indicato nella sezione D, Tabella 2. Applicare i nuovi Covertiles.
34. Caricate il vassoio dei vetrini nel BOND e premete il pulsante **Load/Unload**.
35. Confermate che i vetrini sono stati scansionati e fate clic sul pulsante **Run (Play)** nella schermata Stato sistema.
36. Verificate che nel campo indicazione vassoio compaia **Proc (OK)** e che vengano visualizzati il numero di lotto e l'ora di fine.
37. Quando la seduta è completa, premete il pulsante **Load/Unload** e rimuovete i vassoi dei vetrini dal BOND.
38. Rimuovete i Covertiles e risciacquate i vetrini con acqua deionizzata.
39. Disidratate, pulite e montate le sezioni.

Controllo qualità

Le differenze nella fissazione, lavorazione e inclusione dei tessuti nel laboratorio del singolo utilizzatore può comportare una notevole variabilità di risultati che necessita quindi di controlli interni regolari oltre agli HER2 Control Slides forniti da Leica Biosystems nel Bond Oracle HER2 IHC System. Consultate le linee guida relative al controllo qualità del College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry; si veda inoltre CLSI (ex NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) e Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18). Inoltre, consultate la Tabella 3 qui sotto per i tipi di controlli qualità immunoistochimici e i loro scopi.

Campione*	Descrizione	Colorazione HER2 Primary Antibody	Colorazione HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	Come fornito nel Bond Oracle HER2 IHC System.	Controlla la procedura di colorazione e indica la validità della performance dei reagenti.	Rilevamento di colorazione specifica di fondo
Controllo di tessuto positivo interno	Tessuto contenente antigeni target. Il controllo ideale consiste in un tessuto di colorazione lievemente positiva in modo da definire i cambiamenti più impercettibili nella sensibilità degli anticorpi primari.	Controlla tutte le fasi dell'analisi. Convalida la preparazione dei tessuti e la performance di colorazione del Bond Oracle HER2 IHC System.	
Componente per il tessuto di controllo negativo interno	I tessuti o le cellule presumibilmente negativi (potrebbero trovarsi nel tessuto del paziente o nei componenti di tessuto di controllo positivo/negativo).	Rilevamento di cross-reattività degli anticorpi aspecifici con cellule/componenti cellulari.	

*Fissato ed elaborato per campione paziente

Tabella 3. Controlli di qualità immunoistochimici e loro scopo.

Il tessuto di controllo dovrebbe consistere in campioni biotici o chirurgici, fissati in formalina, elaborati e inclusi in paraffina il prima possibile, allo stesso modo dei campioni dei pazienti. I campioni devono essere maneggiati con cura per conservare l'antigenicità del tessuto per la colorazione immunoistochimica. I metodi standard per l'elaborazione dei tessuti dovrebbero essere utilizzati per tutti i campioni (17).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Ciascuno degli HER2 Control Slides forniti contiene quattro nuclei di linea cellulare umana di tumore al seno fissati in formalina e inclusi in paraffina con punteggi di intensità di colorazione pari a 0, 1+, 2+ e 3+. Ogni seduta test deve includere un vetrino (ossia, un vassoio vetrini). La valutazione corretta dell'HER2 Control Slide fornito da Leica Biosystems' indica la validità del test (si veda la guida Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Gli HER2 Control Slides forniti con questo sistema convalidano soltanto la performance dei reagenti e non verificano la preparazione dei tessuti.

Tessuto di Controllo positivo interno – HER2 Primary Antibody

In caso di utilizzo di componenti di tessuto di controllo positivo interno, questi dovrebbero consistere in campioni biotici o chirurgici, fissati, trattati e inclusi il prima possibile, allo stesso modo dei campioni dei pazienti. I controlli positivi dei tessuti sono indicativi di tessuti correttamente preparati e di tecniche di colorazione valide. Bisognerebbe includere almeno un componente di controllo positivo per ciascuna seduta test. La sezione di controllo positivo dovrebbe mostrare una colorazione lievemente positiva in modo da definire i cambiamenti più impercettibili nella sensibilità degli anticorpi primari.

Nota: i componenti noti del tessuto di controllo positivo dovrebbero essere utilizzati soltanto per monitorare la performance corretta dei tessuti elaborati insieme ai reagenti test, NON come ausilio nel formulare un'interpretazione specifica dei campioni paziente. Se il tessuto di controllo positivo non mostra una colorazione positiva appropriata, i risultati ottenuti con i campioni paziente non vanno considerati validi.

Anche un blocco di controllo multitessuto contenente tumori che rappresentano tutti i 4 livelli di HER2 può essere efficacemente utilizzato come materiale appropriato di controllo interno.

Componente di tessuto di controllo negativo interno – HER2 Primary Antibody

In caso di utilizzo di componenti di tessuto di controllo negativo interno, questi dovrebbero consistere in campioni biotici freschi o chirurgici, fissati, trattati e inclusi il prima possibile, allo stesso modo dei campioni paziente. L'uso del tessuto di controllo, noto per essere negativo all'oncoproteina HER2, per ogni seduta di colorazione verifica la specificità dell'anticorpo primario e fornisce un'indicazione sull'eventuale colorazione di fondo aspecifica. La varietà di diversi tipi di cellule presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre siti di controllo negativo interno (da verificare da parte dell'utilizzatore). Dotti mammari normali non associati a tumore possono fornire un riferimento per la validità dell'analisi. Qualora si verificasse una colorazione specifica nel tessuto di controllo negativo interno, i risultati dei campioni paziente non dovrebbero essere considerati validi.

L'utilizzo di blocchi di controllo multitessuto, che rappresentano tutti i quattro livelli di HER2, può essere previsto per i tessuti di controllo positivo e negativo.

Tessuto paziente – HER2 Negative Control

Utilizzate HER2 Negative Control fornito al posto di HER2 Primary Antibody su una sezione corrispondente per ciascun test paziente al fine di valutare la colorazione aspecifica e consentire un'accurata interpretazione della colorazione dell'oncoproteina specifica HER2 nel sito antigenico.

Tessuto paziente – HER2 Primary Antibody

L'intensità della colorazione positiva dovrebbe essere valutata nel contesto di qualsiasi colorazione di fondo aspecifica con HER2 Negative Control. Come con qualsiasi test immunostochimico, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene fosse assente nelle cellule/tessuto analizzati. Consultate le sezioni **Razionale per l'ordine di screening dei vetrini, Limitazioni, Valutazione della performance e Immunoreattività** per ottenere informazioni specifiche riguardanti l'immunoreattività del Bond Oracle HER2 IHC System.

Verifica dell'analisi

Prima dell'utilizzo iniziale di qualsiasi sistema di anticorpi o di colorazione in una procedura diagnostica, l'utilizzatore dovrebbe verificare la specificità degli anticorpi testandola su una serie di tessuti interni con profili immunostochimici positivi o negativi noti. Si veda la sezione **Controllo Qualità** descritta in precedenza e i requisiti del controllo qualità del CAP Certification Program for Immunohistochemistry e/o CLSI (ex NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry,

Approved Guideline (17). Queste procedure di controllo qualità vanno ripetute per ciascun nuovo lotto di anticorpi o qualora si verificano dei cambiamenti nei parametri dell'analisi. I carcinomi mammari duttali (infiltranti) invasivi umani con intensità di colorazione dell'oncoproteina HER2 compresa tra 0 e 3+ e altri tessuti opportunamente negativi sono adatti per la verifica dell'analisi.

Interpretazione della colorazione - Mammario

Per la determinazione dell'espressione dell'oncoproteina HER2, soltanto il modello di colorazione della membrana e l'intensità andranno valutati utilizzando la scala presentata nella Tabella 4. La valutazione del vetrino dovrà essere fatta da un patologo con microscopio in campo chiaro. Per valutare la colorazione e il punteggio immunistochimico, è possibile utilizzare un obiettivo con ingrandimento 10x. L'utilizzo di un obiettivo con ingrandimento 20–40x dovrà essere utilizzato per confermare il punteggio. La colorazione citoplasmica dovrebbe essere considerata come colorazione aspecifica e non va inclusa nella valutazione dell'intensità di colorazione della membrana (19). Per assistenza in materia di differenziazione della colorazione 0, 1+, 2+, e 3+, si veda la guida Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide per le immagini rappresentative delle intensità di colorazione. Vanno calcolati soltanto i campioni di pazienti affetti da carcinoma mammario invasivo. In casi di carcinoma *in situ* e di carcinoma invasivo nello stesso campione, va conteggiato soltanto il componente invasivo.

Modello di colorazione immunistochimico	Punteggio	Valutazione
Non è stata osservata nessuna colorazione né colorazione della membrana in meno del 10% delle cellule tumorali.	0	Negativo
La colorazione indistinta/quasi impercettibile della membrana viene rilevata in oltre il 10% delle cellule tumorali. Viene colorata soltanto una parte della membrana delle cellule.	1+	Negativo
La colorazione debole o moderata della membrana viene rilevata in oltre il 10% delle cellule tumorali.	2+	Equivoco (Leggermente positivo)
La colorazione completa e decisa della membrana viene rilevata in oltre il 10% delle cellule tumorali.	3+	Decisamente positivo

Tabella 4. Interpretazione della colorazione HER2

I risultati della colorazione del Bond Oracle HER2 IHC System vengono interpretati come negativi per l'espressione dell'oncoproteina HER2 con punteggi di intensità della colorazione pari a 0 e 1+, equivoci (leggermente positivi) con punteggio di intensità della colorazione pari a 2+, e decisamente positivi con punteggio di intensità della colorazione pari a 3+. Il Bond Oracle HER2 IHC System non ha il compito di fornire informazioni prognostiche al paziente e/o al medico e non è stato convalidato per questo scopo. Per ciascuna valutazione della colorazione, i vetrini vanno esaminati nell'ordine presentato di seguito per determinare la validità della seduta di colorazione e consentire una valutazione semi-quantitativa dell'intensità di colorazione del tessuto campione.

Razionale per l'ordine di screening dei vetrini

I vetrini dovrebbero essere selezionati nel seguente ordine:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Un'analisi valida con Oracle HER2 Control Slide mostra:

Interpretazione della colorazione - Gastrico

Per la determinazione dell'espressione dell'oncoproteina HER2, soltanto il modello di colorazione della membrana e l'intensità andranno valutati utilizzando la scala presentata nella Tabella 5 e 6. La valutazione del vetrino dovrà essere fatta da un patologo con microscopio in campo chiaro. Per valutare la colorazione e il punteggio immunostochimico, è possibile utilizzare un obiettivo con ingrandimento 10x. L'utilizzo di un obiettivo con ingrandimento 20–40x dovrà essere utilizzato per confermare il punteggio. La colorazione citoplasmica dovrebbe essere considerata come colorazione aspecifica e non va inclusa nella valutazione dell'intensità di colorazione della membrana (15). Per assistenza in materia di differenziazione della colorazione 0, 1+, 2+, e 3+, si veda Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide per le immagini rappresentative delle intensità di colorazione. Dovrebbero essere conteggiati solo i campioni appartenenti a pazienti affetti da adenocarcinoma dello stomaco e del giunto gastroesofageo.

	Modello di colorazione immunostochimica	Pun- teggio	Valutazione
Campioni chirurgici	Non è stata osservata nessuna colorazione né colorazione della membrana in meno del 10% delle cellule tumorali.	0	Negativo
	La colorazione indistinta/quasi impercettibile della membrana viene rilevata in oltre il 10% delle cellule tumorali. Viene colorata soltanto una parte della membrana delle cellule.	1+	Negativo
	La colorazione completa, basolaterale o laterale debole-moderata della membrana viene osservata nel 10% o oltre delle cellule tumorali.	2+	Equivoco (Leggermente positivo)
	La colorazione completa, basolaterale o laterale decisa della membrana viene osservata in oltre il 10% delle cellule tumorali.	3+	Decisamente positivo

Tabella 5. Interpretazione della colorazione dell'HER2 nei campioni chirurgici con tumore gastrico

	Modello di colorazione immunostochimica	Pun- teggio	Valutazione
Campioni biotipici	Nessuna colorazione rilevata in nessuna cellula tumorale	0	Negativo
	Viene osservato un gruppo di cellule tumorali con colorazione della membrana indistinta/quasi impercettibile, indipendentemente dalla percentuale di cellule colorate	1+	Negativo
	Viene osservato un gruppo di cellule tumorali con colorazione completa, basolaterale o laterale debole-moderata della membrana, indipendentemente dalla percentuale di cellule colorate	2+	Equivoco (Leggermente positivo)
	Osservato un gruppo di cellule tumorali con colorazione completa, basolaterale o laterale decisa della membrana, indipendentemente dalla percentuale di cellule colorate	3+	Decisamente positivo

Tabella 6. Interpretazione della colorazione dell'HER2 nei campioni biotipici con tumore gastrico

Per l'interpretazione delle biopsie colorate con Bond Oracle HER2 IHC System è consigliato un gruppo composto almeno da cinque cellule tumorali.

- la presenza di colorazione marrone scuro della membrana cellulare completa nella Linea Cellulare di controllo 3+ SK-BR-3.
- la presenza di colorazione da marrone chiaro a intermedio della membrana cellulare completa nella Linea cellulare di controllo 2+ MDA-MB-453.
- la presenza di colorazione marrone chiarissimo/quasi impercettibile della membrana cellulare completa nella Linea cellulare di controllo 1+ MDA-MB-175.
- Nessuna colorazione nella linea cellulare di controllo 0 MDA-MB-231.

Nota importante: una caratteristica della linea cellulare di controllo MDA-MB-175 1+ riguarda un modello di crescita distinto nel quale le cellule formano dei gruppi. Questi gruppi formano una regione luminale continua con orletto a spazzola nel gruppo cellulare. Questa colorazione dell'orletto a spazzola sarà più marcata rispetto a quella del resto della membrana. La colorazione della membrana cellulare incompleta leggera/quasi impercettibile costituisce il modello esatto di colorazione 1+ dell'oncoproteina HER2. In questa linea cellulare è possibile altresì osservare l'immunocolorazione a puntini della regione di Golgi nel citoplasma.

2. Tessuto di controllo positivo interno – HER2 Primary Antibody

La PRESENZA della colorazione marrone della membrana dovrebbe essere osservata in corrispondenza dello status noto dell'oncoproteina HER2 del controllo positivo scelto.

3. Componente del tessuto di controllo negativo interno – HER2 Positive Control

Si dovrebbe verificare L'ASSENZA di colorazione della membrana. Un componente del tessuto di controllo negativo conferma la mancanza di cross-reattività del sistema di rilevamento rispetto alle cellule/componenti cellulari specificamente mirati. Qualora si verificasse una colorazione della membrana nel componente del tessuto di controllo negativo, i risultati dei campioni paziente non andrebbero considerati validi.

4. Tessuto pazienti – colorato utilizzando HER2 Negative Control

L'ASSENZA di colorazione della membrana verifica l'etichettatura specifica dell'antigene target mediante l'anticorpo primario. Altre colorazioni marroni nel citoplasma del campione trattato con HER2 Negative Control, come nel tessuto connettivo, nei leucociti, eritrociti o nel tessuto necrotico, vanno considerate colorazioni di fondo aspecifiche e annotate.

5. Tessuto pazienti – colorato utilizzando HER2 Primary Antibody

I livelli di espressione dell'oncoproteina HER2 vengono determinati dai criteri definiti sia nella Tabella 4-6 che nella guida Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

Limitazioni

A. Limitazioni generali

L'immunoistochimica è una tecnica di laboratorio multi-fase utilizzata come ausilio nell'interpretazione e determinazione delle caratteristiche istopatologiche. Si tratta di una tecnica che richiede una formazione specializzata in tutti gli aspetti procedurali (inclusa la selezione di reagenti appropriati, tessuti, fissazione, trattamento e preparazione del vetrino IHC) e nell'interpretazione.

La colorazione immunoistochimica dei tessuti dipende dal modo in cui i tessuti sono stati maneggiati, fissati e lavorati prima della colorazione. Una fissazione errata, un congelamento, decongelamento, lavaggio, essiccazione, riscaldamento, sezionamento o contaminazione con altri tessuti o fluidi può produrre artefatti, trapping dell'anticorpo o risultati falsi negativi. I risultati incoerenti possono essere imputabili a variazioni nella fissazione, ai metodi di inclusione o a irregolarità inerenti al tessuto (21). Una controcolorazione eccessiva o incompleta può inoltre compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

La colorazione aspecifica, se presente, ha solitamente un aspetto diffuso. La colorazione

sporadica di tessuti connettivi può inoltre essere osservata in sezioni provenienti da tessuti eccessivamente fissati in formalina. Utilizzate cellule intatte per l'interpretazione dei risultati della colorazione. Cellule necrotiche o degenerate spesso presentano una colorazione aspecifica (22). I risultati falsi-positivi possono essere causati da un legame non immunologico delle proteine o da prodotti di reazione del substrato. Possono inoltre essere causati da enzimi endogeni quali pseudoperossidasi (eritrociti) o perossidasi endogena (citocromo C), in base al tipo di colorazione immunistochimica utilizzata.

I tessuti dei pazienti affetti dal virus dell'epatite B e l'antigene di superficie contenente il virus dell'epatite B (HBsAg) possono mostrare una colorazione aspecifica con perossidasi da rafano (23).

Una colorazione immunistochimica inattesa o variazioni nella colorazione possono essere il risultato di alterazioni nei livelli di espressione dei geni o antigeni codificanti. Qualsiasi cambiamento nei modelli di colorazione previsti deve essere interpretato in associazione alle altre indagini diagnostiche.

L'interpretazione della colorazione immunistochimica deve essere completata da studi morfologici e dall'uso di materiali di controllo appropriati e va valutata nel contesto della storia clinica del paziente e qualsiasi altro test diagnostico da parte di un patologo qualificato.

L'esecuzione dell'analisi (ossia la valutazione dell'adeguatezza sia dei controlli positivi che negativi) e l'interpretazione di un'eventuale colorazione immunistochimica o la sua assenza devono essere condotte in laboratori accreditati/autorizzati sotto la supervisione di un patologo competente ed esperto, responsabile dell'intera valutazione dell'analisi immunistochimica e della sua interpretazione.

B. Limitazioni specifiche del prodotto

Questo prodotto non va utilizzato nella citometria a flusso. Le sue caratteristiche prestazionali non sono state determinate per la citometria a flusso.

I risultati falsi negativi possono essere visti come il risultato del degrado degli antigeni nella sezione tissutale. I vetrini necessari per la valutazione dell'oncoproteina HER2 e la verifica dei tumori devono essere preparati nello stesso momento. Per conservare l'antigenicità, le sezioni tissutali montate sui vetrini (Leica BOND Plus Slides – codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040) andrebbero colorate entro 4-6 settimane dal sezionamento e mantenute a temperatura ambiente (18–24 °C). In seguito al sezionamento, si raccomanda di incubare i vetrini per 12-18 ore a 37 °C. Le sezioni che richiedono ulteriore aderenza possono essere incubate a 60 °C per un'altra ora.

La variazione naturale minima del profilo immunistochimico verrà riscontrata tra i lotti di crescita delle linee cellulari utilizzati nel Bond Oracle HER2 IHC System. Questa variazione naturale rientra nei livelli di tolleranza accettabili di un'entità biologica e non influenza l'interpretazione della performance del sistema.

La caratterizzazione delle linee cellulari che utilizzano sia la citometria a flusso sia l'ibridazione in situ come presentate nella Tabella 7 è inoltre soggetta alla variazione biologica naturale. Viene inoltre riportata la variazione tecnica e interpretativa delle linee cellulari di controllo come valutate dall'ibridazione fluorescente in situ (24).

La valutazione di HER2 Control Slides dovrebbe inoltre prendere in considerazione le relative date di scadenza. Conservate Bond Oracle HER2 IHC System a 2–8 °C. Non congelare. Riportare a 2–8 °C subito dopo l'uso. Qualsiasi discostamento da queste condizioni invaliderà l'analisi.

Non sostituite i reagenti del Bond Oracle HER2 IHC System con qualsiasi altro componente fornito da Leica Biosystems' o da altri produttori. Questo renderebbe nulla l'analisi.

È essenziale che tutte le fasi descritte nelle sezioni da C a E (Procedura) vengano eseguite nell'ordine raccomandato. Qualsiasi discostamento dall'ordine invaliderà l'analisi.

È fondamentale che durante l'analisi vengano utilizzati tessuti fissati soltanto con fissativi a base di formalina. L'uso di qualsiasi altro tipo di fissativo renderà nulla l'analisi.

Le sezioni tissutali tagliate al di fuori dell'intervallo di spessore raccomandato non sono

valide. L'utilizzo di qualsiasi altro spessore per la sezione potrebbe rendere nulla l'analisi.

Dati della linea cellulare

Linea cellulare	Profilo Bond Oracle HER2 IHC System	Carico recettore per cellula* HER2	Stato Amplificazione Gene HER2 *	
			Numero copia HER2	HER2:Chr17 Rapporto gene
SK-BR-3	3+	4,3x10 ⁵	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4x10 ⁵	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3x10 ⁴	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3x10 ³	3,15	1,13

*Analisi del carico del recettore HER2 come valutata dalla citometria a flusso. * Stato di amplificazione del gene HER2 come valutato dalla sonda duale (HER2:Cromosoma 17) FISH.

Tabella 7. Profilo HER2 Control Slide

Concordanza clinica del Bond Oracle HER2 IHC System vs. Dako HercepTest - Mammario

La prima parte dello studio esaminava l'adeguatezza del Bond Oracle HER2 IHC System come strumento di ausilio nel determinare il trattamento con la terapia Herceptin® (trastuzumab). Lo studio è stato concepito per esaminare la concordanza tra il Bond Oracle HER2 IHC System e il Dako HercepTest, considerato come lo 'standard di riferimento' per questa analisi. Il criterio di accettazione è stato definito come superiore al 75% per la concordanza generale tra i due test con un intervallo di confidenza del 95% (CI).

Lo studio è stato condotto "in cieco", con base negli Stati Uniti e con due siti. A ciascun sito di indagine sono stati forniti campioni di tumore al seno fissati in formalina e inclusi in paraffina di stato HER2 noto. I casi sono stati selezionati in ordine consecutivo contrario dagli archivi clinici rappresentanti il flusso consecutivo dei casi in un dipartimento istopatologico per il test clinico, e testati indipendentemente dagli altri fattori di prognosi e/o di predizione, senza errori nelle coorti. Le coorti dei 160 e 292 campioni sono state testate rispettivamente nel Sito 1 e nel Sito 2. Ciascuna coorte aveva una rappresentazione uguale di casi equivoci/positivi (2+, 3+) e negativi (0, 1+), in base ai punteggi HER2 IHC precedentemente assegnati, portando ad una popolazione di studio totale di 452 campioni. Dodici (12) campioni sono stati considerati inadatti per via della mancanza di sufficiente tumore invasivo e sono stati eliminati dallo studio. Altri nove (9) campioni non hanno potuto essere conteggiati in seguito al sollevamento del tessuto dalla superficie del vetrino, portando così ad una popolazione di studio finale di 431 campioni.

Tutti i casi sono stati colorati con l'HercepTest secondo le istruzioni del produttore presenti nella confezione. Le sezioni sequenziali di ogni caso sono state colorate con il Bond Oracle HER2 IHC System su un sistema di colorazione avanzato Leica Biosystems' BOND completamente automatizzato. Tutti i casi sono stati scollegati dalle informazioni uniche di identificazione del paziente e sono stati correlati di dati clinici relativi alla dimensione del tumore, alla fase del tumore, al livello del tumore e allo stato del recettore di estrogeni.

Tutti i vetrini colorati sono stati mascherati e valutati in maniera casuale da osservatori qualificati nei due siti. Per l'analisi di concordanza 2x2, i punteggi sono stati interpretati come negativi quando l'intensità di colorazione era pari a 0 o 1+, e positivi per punteggi pari a 2+ o 3+. Per l'analisi di concordanza 3x3, i punteggi sono stati interpretati come negativi quando la colorazione era pari a 0 o 1+, equivoci per punteggi pari a 2+ e positivi per punteggi pari a 3+. I dati sono quindi stati analizzati in termini di concordanza di colorazione positiva e negativa.

Risultati concordanza 2x2

In questa analisi primaria, i risultati ottenuti nei due test (Bond Oracle HER2 IHC System e Dako HercepTest) vengono classificati come negativi (0, 1+) o positivi (2+, 3+). Le frequenze delle quattro possibili combinazioni vengono visualizzate in un formato di tabella 2x2 (cfr. Tabella 8). Quindi, il tasso di concordanza globale basato su questa tabella 2x2 è stato calcolato insieme ad un intervallo di confidenza esatto pari al 95% (in base alla distribuzione binomiale).

L'ipotesi nulla (H_0), a cui si contrappongono i criteri di successo, vede la concordanza non superiore al 75%.

L'accordo osservato per 431 campioni tra i due test in un'analisi 2x2 mostra una concordanza del 92,34% (398/431) con un CI del 95% di 89,42% - 94,67%. Questi dati supportano il rifiuto dell'ipotesi nulla (H_0) quando l'accordo non è superiore al 75% con un valore $p < 0,0001$.

La percentuale di Accordo Positivo (sensibilità) o la capacità di Bond Oracle HER2 IHC System di individuare correttamente i casi positivi HercepTest (la percentuale dei campioni giudicati positivi sia dal Bond Oracle HER2 IHC System sia dall'HercepTest su tutti i casi positivi di HercepTest) era pari all'84,87% (129/152) con un CI del 95% di 78,17%-90,16%. La percentuale di Accordo Negativo (sensibilità) o la capacità del test di individuare correttamente i casi negativi di HercepTest (la percentuale dei campioni giudicati negativi sia dal Bond Oracle HER2 IHC System sia dall'HercepTest su tutti i casi negativi di HercepTest) era pari al 96,42% (269/279) con un CI del 95% di 93,51%-98,27%.

		HercepTest		
		Negativo	Positivo	Totali
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo	269	23	292
	Positivo	10	129	139
	Totali	279	152	431

Concordanza 2x2 (CI del 95%) = 92,34% (da 89,42 a 94,67%); $p < 0,0001$

Tabella 8. Concordanza 2x2 del Bond Oracle HER2 IHC System con HercepTest

Risultati concordanza 3x3

I dati sono stati raggruppati come negativi (0 o 1+), equivoci (2+) o positivi (3+) per l'analisi 3x3 e hanno mostrato una concordanza dell'86,54% (373/431) con un CI del 95% da 82,95% a 89,62%. Pertanto l'ipotesi nulla (H_0), per cui l'accordo non è superiore al 75%, è stata rifiutata con un valore $p < 0,0001$.

La percentuale di Accordo Positivo per 3+ (la percentuale di campioni ha ottenuto un punteggio

positivo di 3+ sia da parte del Bond Oracle HER2 IHC System sia dell'HercepTest su tutti i casi positivi 3+ di HercepTest) in questo studio era pari al 73,33% (66/90) con un CI del 95% dal 62,97% all'82,11%. La percentuale di Accordo Negativo era pari al 96,42% (269/279) con un CI del 95% dal 93,51% al 98,27. Cfr. Tabella 9.

		HercepTest			
		Negativo (0 o 1+)	2+	3+	Totali
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo (0 o 1+)	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	Totali	279	62	90	431

Concordanza 3x3 (CI del 95%) = 86,54% (da 82,95 a 89,62%); $p < 0,0001$

Tabella 9. Concordanza 3x3 del Bond Oracle HER2 IHC System con HercepTest

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio dimostrano che il Bond Oracle HER2 IHC System può essere utilizzato come strumento di ausilio nella determinazione del trattamento per la terapia a base di Herceptin® (trastuzumab), a seguito della sua elevata concordanza con l'HercepTest.

Concordanza clinica del Bond Oracle HER2 IHC System rispetto vs. PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mammario

La seconda parte dello studio è stata elaborata per esaminare la concordanza tra il Bond Oracle HER2 IHC System e l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerato come lo standard di riferimento per l'analisi del riflesso della valutazione genica insieme

all'immunohistochimica HER2.

Il presente studio è stato condotto negli stessi siti di indagine e si è avvalso delle stesse coorti di studio della Parte 1. Tutti i casi sono stati colorati con l'Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit secondo le istruzioni del produttore presenti nella confezione. Le sezioni sequenziali di ogni caso sono state colorate con il Bond Oracle HER2 IHC System su un sistema di colorazione avanzato BOND completamente automatizzato (dalla parte 1 dello studio clinico). Su 431 casi non sono stati ottenuti risultati in tre occasioni, a causa di un'insufficiente ibridazione della sonda, il che ha portato ad una coorte totale di 428 casi.

Tutti i vetrini colorati sono stati valutati da osservatori qualificati in due siti di indagine. Per l'analisi di concordanza 3x2, i punteggi sono stati interpretati come negativi quando il rapporto di amplificazione dei geni HER2/CEP17 era inferiore a (<) 2,0, e positivi quando era superiore o uguale a (>) 2,0 dopo una conta di 20 cellule tumorali.

Risultati concordanza 3x2

L'accordo osservato per 428 campioni tra i due test in un'analisi 3x2 mostra una concordanza dell'87,6% (375/428) con un CI del 95% dall'84% al 90%.

La percentuale di Accordo Positivo (sensibilità) o la capacità di Bond Oracle HER2 IHC System di individuare correttamente i casi positivi PathVysion (la percentuale dei campioni giudicati positivi sia dal Bond Oracle HER2 IHC System sia dal PathVysion su tutti i casi positivi di PathVysion) era pari al 93,8% (61+30/97) con un CI del 95% dall'86,8% al 97,4%.

La percentuale di Accordo Negativo (specificità) o la capacità del test di individuare correttamente i casi negativi di PathVysion (la percentuale dei campioni giudicati negativi sia dal Bond Oracle HER2 IHC System sia dal PathVysion su tutti i casi negativi di PathVysion) era pari all'85,8% (284/331) con un CI del 95% da 81,6% a 89,2%. Cfr. Tabella 10.

		PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativo	Positivo	Totali
Bond Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	Totali	331	97	428

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 87,6% (da 84,1 a 90,6%)

Tabella 10. Concordanza 3x2 della colorazione Bond Oracle HER2 IHC System vs. kit PathVysion HER-2 DNA Probe.

Concordanza clinica di Bond Oracle HER2 IHC System con Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Gastrico

L'obiettivo della terza parte dello studio era di creare dati dai campioni di tumore gastrico in stadio avanzato fissati in formalina e conservati in paraffina, al fine di esaminare la concordanza tra il Bond Oracle HER2 IHC System completamente automatizzato sul sistema di colorazione BOND avanzato e completamente automatizzato, utilizzando il Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Il criterio di accettazione per questa terza parte è stato definito come superiore al 75 % per la concordanza generale tra

i due test.

Per l'analisi di concordanza 2x2, i punteggi sono stati interpretati come negativi quando l'intensità di colorazione era pari a 0 o 1+, e positivi per punteggi pari a 2+ o 3+. Per l'analisi di concordanza 3x3, i punteggi sono stati interpretati come negativi quando la colorazione era pari a 0 o 1+, equivoci per punteggi pari a 2+ e positivi per punteggi pari a 3+. I dati sono stati anche analizzati in termini di concordanza di colorazione positiva e negativa.

Risultati - Bond Oracle HER2 IHC System in confronto a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Gastrico

Risultati concordanza 2x2

La concordanza tra il Bond Oracle HER2 IHC System completamente automatizzato e il Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) è stata studiata su 287 campioni, utilizzando il sistema di colorazione BOND avanzato e completamente automatizzato.

La concordanza osservata tra i due test in un'analisi 2x2 era pari al 95.12% (273/287) con un CI del 95% tra 91.95% e 97.31%. Questi dati supportano il rifiuto dell'ipotesi nulla (H_0) quando l'accordo non è superiore al 75% con un valore $p < 0,0001$. La percentuale di concordanza positiva (sensibilità) o capacità da parte di Bond Oracle HER2 IHC System di identificare correttamente i campioni positivi di Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (percentuale di campioni segnati come positivi sia da Bond Oracle HER2 IHC System che da Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) tra tutti i campioni positivi di Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) era pari all'90.79% (138/152) con un CI del 95% CI tra 85.03% e 94.87%. La percentuale di concordanza negativa (specificità) o capacità del test di identificare correttamente i campioni negativi di Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (percentuale di campioni segnati come negativi sia da Bond Oracle HER2 IHC System che da Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) tra tutti i campioni negativi di Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) era pari al 100% (135/135) con un CI del 95% CI tra 97.30% e 100% (cfr. Tabella 11).

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)		
		Negativo	Positivo	Totali
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo	135	14	149
	Positivo	0	138	138
	Totali	135	152	287

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 95.12% (91.95-97.31%)

Tabella 11. Concordanza 2x2 della colorazione di Bond Oracle HER2 IHC System con Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody su tessuto gastrico.

Risultati concordanza 3x3

La concordanza osservata tra i due test in un'analisi 3x3 era pari all'89.90% (258/287) con un CI del 95% tra 85.81% e 93.13%. Pertanto l'ipotesi nulla (H_0), per cui l'accordo non è superiore al 75%, è stata rifiutata con un valore $p < 0,0001$. La percentuale di concordanza positiva per 3+ o capacità da parte di Bond Oracle HER2 IHC System di identificare correttamente i campioni

positivi del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (percentuale di campioni segnati come positivi per 3+ sia da Bond Oracle HER2 IHC System che da Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) tra tutti i campioni positivi per 3+ del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) era pari all'85.94% (110/128) con un CI del 95% tra 78.69% e 91.45%. La percentuale di concordanza negativa (specificità) o capacità del test di identificare correttamente i campioni negativi del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (percentuale di campioni segnati come negativi sia da Bond Oracle HER2 IHC System che da Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) tra tutti i campioni negativi del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) era pari al 100% (135/135) con un CI del 95% tra 97.30% e 100%. Cfr. Tabella 12.

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)			
		Negativo (0 o 1+)	2+	3+	Totali
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo (0 o 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	Totali	135	24	128	287

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 89.90% (85.81-93.13%)

Tabella 12. Concordanza 3x3 della colorazione di Bond Oracle HER2 IHC System con Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody su tessuto gastrico.

Immunoreattività – Pannello normale

Tipo di tessuto normale	Modello di colorazione	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Adrenale	Negativo	Negativo
Cerebrale, Cervelletto	Negativo	Negativo
Cerebrale, Cervello	Negativo	Negativo
Mammario	Negativo	Negativo
Midollare	Negativo	Negativo
Colon	Negativo	Negativo
Esofageo	Negativo	Negativo
Oculare	Negativo	Negativo
Ipfosi	Colorazione citoplasmica moderata osservata nelle cellule ipofisarie (1/3)	Negativo
Renale	Negativo	Negativo
Laringeo	Negativo	Negativo
Epatico	Negativo	Negativo
Polmonare	Negativo	Negativo
Mesotelio	Negativo	Negativo
Ovarico	Negativo	Negativo
Pancreatico	Negativo	Negativo
Paratiroideo	Negativo	Negativo
Nervo periferico	Negativo	Negativo
Prostatico	Negativo	Negativo
Ghiandola salivare	Negativo	Negativo
Cutaneo	Negativo	Negativo
Piccolo intestino	Negativo	Negativo
Milza	Negativo	Negativo
Stomaco	Lieve colorazione citoplasmica osservata nelle ghiandole gastriche (2/3)	Negativo
Muscolo striato	Negativo	Negativo
Testicolo	Negativo	Negativo
Timo	Negativo	Negativo
Tiroide	Negativo	Negativo
Tonsille	Negativo	Negativo
Cervice uterina	Negativo	Negativo
Utero	Negativo	Negativo

Tabella 13. Colorazione pannello normale

Studio di riproducibilità

Test di precisione intraseduta e interseduta

I test di precisione sono stati realizzati presso Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Il

tessuto utilizzato era un tissue microarray (TMA) composito fissato in formalina e incluso in paraffina fornito da Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchondong, Seoul, 120-752 Korea), comprendente nuclei tissutali di carcinoma mammario invasivo del diametro di 4 mm. I 20 casi sono stati selezionati in base ai punteggi HER2 precedentemente assegnati. Su questa base, sono stati inclusi 5 casi di HER2 3+, 5 casi di HER2 2+, 5 casi di HER2 1+ e 5 casi di HER2 0.

A. Test di precisione intraseduta

Il test di precisione intraseduta del Bond Oracle HER2 IHC System è stato valutato su un totale di 40 sezioni consecutive di un TMA comprendente 20 tumori al seno invasivi e 40 HER2 Control Slides. Tutti i vetrini sono stati colorati con il Bond Oracle HER2 IHC System sul sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND. Le sezioni sono state colorate per un periodo continuo utilizzando un Bond Oracle HER2 IHC System proveniente dallo stesso lotto di produzione. Le sezioni colorate sono state sperimentate e valutate in maniera casuale da un unico osservatore qualificato per determinare la precisione intraseduta.

Una valutazione dei vetrini dell'indagine intraseduta mostrava che era possibile interpretare 733/800 punti dei dati test (91,63%). Sono stati esclusi 40 punti dati per via della presenza solo di DCIS e altri 27 punti dati non hanno potuto essere interpretati per via di una perdita di tumore invasivo (specifico in 3 nuclei). La variazione nella colorazione si è verificata in 61 casi (8,32%) su 733 possibili eventi di colorazione. In 37 occasioni, si è riscontrata la variazione da 3+ a 2+ (n = 20) e da 1+ a 0 (n = 17), non rappresentando così un cambiamento da clinicamente positivo a clinicamente negativo o viceversa in una valutazione dati 2x2. Le restanti 24 (3,27%) occasioni rappresentavano un cambiamento da clinicamente negativo (0 o 1+) a clinicamente positivo (2+ o 3+). Valore "Pass" = 96,7% (CI del 95% = da 95,15% a 97,81%).

B. Test di precisione interseduta

Il test di precisione interseduta del Bond Oracle HER2 IHC System è stato valutato su un totale di 24 sezioni consecutive di un TMA comprendente 20 tumori al seno invasivi e 24 HER2 Control Slides. Tutti i vetrini sono stati colorati con il Bond Oracle HER2 IHC System sul sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND. I vetrini sono stati valutati in 8 sedute indipendenti, eseguite nello stesso laboratorio, in tre diverse occasioni utilizzando il Bond Oracle HER2 IHC System dello stesso lotto di produzione. I vetrini colorati sono stati mascherati e valutati in maniera casuale da un unico osservatore qualificato per determinare la precisione interseduta.

Una valutazione dei vetrini dell'indagine interseduta mostrava che era possibile interpretare 456 su 480 punti dei dati test (95,00%). 24 punti dati non hanno potuto essere interpretati per via di una perdita di tumore invasivo (specifico in 5 nuclei). La variazione nella colorazione si è verificata in 42 casi (9,21%) su 456 punti dati possibili. In 30 occasioni, si è riscontrata la variazione da 3+ a 2+ (n = 10) e da 1+ a 0 (n = 20), non rappresentando così un cambiamento da clinicamente positivo a clinicamente negativo o viceversa in una valutazione dati 2x2. Le restanti 12 (2,63%) occasioni rappresentavano un cambiamento da clinicamente negativo (0 o 1+) a clinicamente positivo (2+ o 3+). Valore "Pass" = 97,37% (CI del 95% = da 95,90% a 98,77%).

C. Riproducibilità da lotto a lotto

Per determinare la riproducibilità da lotto a lotto, sono stati prodotti 3 lotti di Bond Oracle HER2 IHC System in GMP, in 3 diverse occasioni e valutati su 24 sezioni di tumore al seno (24 punti dati test) presi da quattro diversi blocchi di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (rappresentanti intensità di colorazione 0, 1+, 2+ e 3+ HER2) e tre HER2 Control Slides (12 punti dati controllo). Sono state realizzate tre sedute indipendenti nello stesso laboratorio in tre occasioni distinte, utilizzando in ognuna un lotto di produzione diverso di Bond Oracle HER2 IHC System. Tutti i vetrini sono stati colorati con il Bond Oracle HER2 IHC System sul sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND. I vetrini colorati sono stati mascherati e valutati in maniera casuale da un unico osservatore qualificato per determinare la riproducibilità da lotto a lotto.

Una valutazione dei vetrini (test e controlli) dell'indagine lotto per lotto mostrava che era possibile interpretare 36 punti su 36 dei dati test. In 36 punti dati non si è verificata nessuna variazione di colorazione tra i tre diversi lotti di produzione del Bond Oracle HER2 IHC System. La colorazione con il Bond Oracle HER2 IHC System è coerente in tutti i lotti di produzione.

D. Riproducibilità interlaboratorio

Il test della riproducibilità interlaboratorio del Bond Oracle HER2 IHC System è stato valutato in 3 siti, Leica Biosystems Newcastle (Sito A), e due laboratori indipendenti (Siti B e C) su un totale di 192 sezioni di una TMA comprendente 20 tumori al seno invasivi e 24 HER2 Control Slides. Delle 192 sezioni di TMA colorate, 96 sono state colorate con HER2 Primary Antibody e 96 con il reagente HER2 Negative Control. Tutti i vetrini sono stati colorati con il Bond Oracle HER2 IHC System sul sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND. I vetrini sono stati valutati in 8 sedute indipendenti eseguite in ciascuno dei 3 diversi siti di indagine utilizzando un Bond Oracle HER2 IHC System dello stesso lotto di produzione. I vetrini colorati sono stati mascherati e valutati in maniera casuale da un unico osservatore qualificato presso Leica Biosystems, Newcastle per determinare la riproducibilità interlaboratorio.

Una valutazione dei vetrini dell'indagine di riproducibilità interlaboratorio mostrava che era possibile interpretare 1477 su 1920 punti dei dati test (76,93%). Non è stato possibile interpretare 443 punti dati test a causa di:

- a) una performance inadeguata del vetrino di controllo HER2 in 2 occasioni su 24 che hanno causato la rimozione di 2 sedute/160 punti dati test. Questo evento si è verificato una volta nel Sito A e una volta nel Sito B (80 punti dati test per sito di indagine rimosso).
- b) una deviazione dal piano test nel Sito C, nel quale 24 vetrini sono stati controcolorati con ematossilina in seguito alla colorazione con Bond Oracle HER2 IHC System. Questo ha prodotto un'eccessiva controcolorazione sia dei vetrini di controllo HER2 sia dei punti dati test TMA che hanno causato la rimozione di 240 punti dati.
- c) una perdita di tumore invasivo che ha causato la rimozione di 23 punti dati test. Questo evento si è verificato in 23 occasioni nel Sito A ed è stato il risultato diretto di una perdita di tessuto nel blocco TMA nella produzione di 192 sezioni TMA consecutive necessarie per completare questa indagine.
- d) una colorazione non interpretabile, imputabile ad un lavaggio inadeguato da parte del sistema di colorazione avanzato completamente automatizzato BOND che ha causato la rimozione di 20 punti dati.

Una valutazione dei vetrini interpretabili nell'indagine di precisione interlaboratorio indicava che la variazione di colorazione si verificava 79 volte (5,28%) su 1477 possibili eventi di colorazione. Di questi, 14 (0,95%) occasioni su 1477 rappresentavano le variazioni da 0 a 1+ o da 2+ a 3+ e come tali non rappresentavano un cambiamento da clinicamente positivo a clinicamente negativo o viceversa in una valutazione dati 2x2. Valore "Pass" = 99,05% (CI del 95% = da 98,42% a 99,46%). Dei 14 eventi di colorazione, 5 (0,34%) su 1477 eventi di colorazione si sono verificati nel laboratorio Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Sito A), 8 su 1477 (0,54%) si sono verificati nel Sito B e 1 su 1477 (0,07%) si sono verificati nel Sito C.

I restanti 65 (4,40%) eventi di colorazione su 1477 mostravano una variazione da 2+ a 1+ e o da 2+ a 0 e pertanto rappresenterebbero un cambiamento da clinicamente positivo a clinicamente negativo o viceversa in una valutazione dati 2x2. Valore "Pass" = 95,6% (CI del 95% = da 94,42% a 96,54%). Dei 65 cambiamenti clinicamente significativi, 11 su 65 (16,9%) si sono verificati nel laboratorio Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Sito A), 24 su 65 (36,9%) si sono verificati nel Sito B e 30 su 65 (46,1%) si sono verificati nel Sito C. Dei cambiamenti clinicamente significativi, non è mai accaduto che un 3+ si trasformasse in un risultato negativo (0 o 1+) o viceversa.

E. Riproducibilità interosservatore

40 casi di tumore al seno invasivo selezionati in maniera casuale, con una distribuzione uguale di ciascuno dei livelli di HER2 IHC (campioni di resezione) sono stati sezionati

consecutivamente e forniti a Leica Biosystems, Newcastle (Sito A), Sito B e Sito C per la colorazione e l'interpretazione. Le sezioni sono state mascherate e randomizzate in ciascun sito prima di calcolare il punteggio. L'accordo interosservatore tra i due siti clinici indipendenti, Sito B e Sito C, era pari all'87,5% (CI del 95% = da 73,3% a 95,8%). L'accordo tra il Sito B e il Sito C e Leica Biosystems Newcastle, Ltd era pari rispettivamente a 92,5% (CI del 95% = da 79,6% a 98,4%) e 85% (CI del 95% = da 70,1% a 94,29%). L'analisi della concorrenza totale tra i tre osservatori (A, B, C) è di 82,50%.

F. Precisione interstrumentale (BOND-MAX vs. BOND-III)

Il test di precisione interstrumentale con il Bond Oracle HER2 IHC System è stato eseguito in un unico sito di indagine indipendente europeo. I campioni testati sono stati ottenuti da sezioni intese fissate in formalina e incluse in paraffina prese da centotrenta otto (138) casi di tumore al seno invasivo (ago e campioni di resezione). Il test interstrumentale è stato eseguito prevedibilmente nel sito di indagine, colorando le sezioni consecutive sulle piattaforme BOND-MAX e BOND-III. Tre (3) casi sono stati considerati non adatti poiché la disponibilità del campione/tumore è stata ritirata dallo studio.

Sono stati utilizzati numeri di lotto identici di Bond Oracle HER2 IHC System e reagenti complementari di strumento BOND per ciascuno strumento. Le sezioni sono state colorate in modo retrospettivo. I vetrini sono stati interpretati nel sito di indagine da un unico osservatore qualificato per la determinazione della precisione interstrumentale.

Una valutazione dei vetrini della precisione interstrumentale ha mostrato una concordanza 2x2 tra il positivo (2+, 3+) e il negativo (0, 1+) di 94,2% (130/138) con un CI del 95% da 88,9 a 97,5% e una concordanza 3x3 tra concordanza positiva (3+), equivoca (2+) e negativa (0, 1+) del 87,0% (120/138) con un CI del 95% da 80,2 a 92,1%.

		BOND-MAX		
		Negativo (0/1+)	Positivo (2/3+)	Totali
BOND-III	Negativo (0/1+)	80	1	81
	Positivo (2/3+)	7	50	57
	Totali	87	51	138

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 94,2% (da 88,9 a 97,5%)

Tabella 14. Concordanza 2x2 della colorazione Bond Oracle HER2 IHC System sulle piattaforme BOND-MAX vs. BOND-III.

		BOND-MAX			
		Negativo (0/1+)	Equivoco (2+)	Positivo (3+)	Totali
BOND-III	Negativo (0/1+)	80	1	0	81
	Equivoco (2+)	6	5	1	12
	Positivo (3+)	1	9	35	45
	Totali	87	15	36	138

Concordanza complessiva (CI del 95%) = 87,0% (da 80,2 a 92,1%)

Tabella 15. Concordanza 3x3 della colorazione Bond Oracle HER2 IHC System sulle piattaforme BOND-MAX vs. BOND-III.

In conclusione, i dati generati in questo studio dimostrano un elevato livello di concordanza tra Leica Biosystems' BOND-MAX e BOND-III Systems quando valutati mediante Bond Oracle HER2 IHC System.

Risoluzione dei problemi

Problema	Probabile causa	Azione correttiva
Nessuna colorazione immunoistochimica	Seduta interrotta prima del completamento	Utilizzando il software BOND, confermate la presenza di qualsiasi errore riportabile durante la seduta di colorazione e agite come indicato dal software BOND.
	Selezione protocollo errata	Verificate che vi sia il default corretto su *IHC Protocol H nel campo protocollo di colorazione della finestra di dialogo Add slide.
	Deparaffinizzazione inadeguata dei vetrini	Accertatevi che sia selezionata la modalità *Dewax nel campo Preparazione della finestra di dialogo Add slide.
	Distribuzione di reagenti sfusi errati	Verificate che tutti i reagenti BOND siano stati assegnati ai contenitori sfusi appropriati e messi in posizione corretta sullo strumento.
	Contaminazione di BOND Wash Solution con azoturo di sodio	Utilizzate la BOND Wash Solution fresca preparata in base alla corretta resistenza di lavorazione.
Lieve colorazione immunoistochimica specifica	Recupero dell'epitopo inadeguato	Verificate che i reagenti BOND Epitope Retrieval siano stati distribuiti nei contenitori appropriati, e che il software BOND sia passato di default al protocollo di recupero epitopo appropriato, *HIER 25 min with *ER1 (97) .
	Fissazione o lavorazione errata dei campioni test	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione.
	Il Bond Oracle HER2 IHC System è stato utilizzato oltre la data di scadenza	Accertatevi che il Bond Oracle HER2 IHC System utilizzato non sia già scaduto.
Eccessiva colorazione immunoistochimica specifica	Recupero dell'epitopo inadeguato	Verificate che i reagenti appropriati di BOND Epitope Retrieval siano stati messi nei contenitori giusti e che il software BOND venga impostato di default su *HIER 25 min with ER1 (97) .
	Variazione nella fissazione	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione. Se possibile, sottoponete il caso ad un nuovo test utilizzando un altro blocco. Se questo non è possibile, valutate le aree che mostrano i migliori modelli di fissazione insieme alla sezione colorata H&E corrispondente.

Problema	Probabile causa	Azione correttiva
Colorazione di fondo aspecifica	Distribuzione di reagenti sfusi errati	Verificate che tutti i reagenti BOND siano stati assegnati ai giusti contenitori e sfusi messi in posizione corretta sullo strumento.
	Deperaffinizzazione inadeguata dei vetrini	Accertatevi che venga selezionato *Dewax nel campo Preparazione della finestra di dialogo Add slide.
	Cross-reazione immunoistochimica aspecifica nel tessuto	Si veda la descrizione del Bond Oracle HER2 IHC System relativa alla cross-reattività dei tessuti normali (cfr. Tabella 13).
	Cross-reazione immunoistochimica aspecifica con aree di necrosi dei tessuti	Accertatevi che venga utilizzato un fissativo a base di formalina e che i tempi di lavorazione siano idonei per il test a cui è sottoposto il campione. Se possibile, sottoponete il caso ad un nuovo test utilizzando un altro blocco. Se ciò non è possibile, valutate le aree che mostrano i migliori modelli di fissazione insieme alla sezione colorata H&E corrispondente.
	Essiccazione dell'artefatto al termine di una seduta di colorazione	Se i vetrini sono sottoposti ad una seduta notturna, si raccomanda di utilizzare la funzionalità di inizio ritardato del BOND. Verificate la disponibilità di un volume adeguato di acqua distillata o deionizzata da mettere sui vetrini in questo periodo per farsi che i vetrini non si asciughino.
	Le sezioni hanno aderito ai vetrini grazie all'utilizzo di additivi a base di amido	Utilizzate vetrini non a base di amido (Leica BOND Plus Slides – codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040).
Tessuto staccato dal(i) vetrino(i) paziente/controllo	Utilizzo del tipo di vetrino errato o drenaggio inadeguato della sezione	Verificate che vengano utilizzati i vetrini giusti per le sezioni paziente/controllo (Leica BOND Plus Slides – codice prodotto S21.2113 o Apex BOND Slides codice prodotto 3800040). Accertatevi che i vetrini siano correttamente drenati e incubati per 12–18 ore a 37 °C (tutta la notte). Le sezioni che richiedono ulteriore aderenza possono essere incubate a 60 °C per un'altra ora.

Tabella 16. Bond Oracle HER2 IHC System risoluzione dei problemi.

In caso di problemi associati al Bond Oracle HER2 IHC System non elencati nella presente guida di risoluzione dei problemi (cfr. Tabella 16), siete pregati di contattare il vostro Ufficio Tecnico locale o Distributore Leica Biosystems' per ricevere assistenza.

Bibliografia

1. Corbett IP, Henry JA, Angus B et al. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Pathology* 1990; 161:15-25.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992-1003.
3. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. al. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:15s, (Abstr 4556).
4. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy resultst from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509
5. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285-9.
6. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165-72.
7. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255-63.
8. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825-31.
9. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1967; 14: 929-931.
10. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International* 1995; 45(2): 108-115.
11. Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008.
12. Bang YJ et al. Poster 4526 presented at the 44th ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, USA, 30 May-3 June 2008.
13. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805.
14. M. Tanner, M. Hollmén, T. T. Junttila, A. I. Kapanen, S. Tammola, Y. Soini, H. Helin, J. Salo, H. Joensuu, E. Sihvo, K. Elenius, and J. Isola. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II α gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology* (February 2005) 16(2): 273-278.
15. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
16. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1990; 17: 234-247.
17. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline*. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087-1898: USA
18. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special Report: Quality control in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1989 ;92: 836-843.
19. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62.

20. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry 2007* (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
23. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
24. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology* 2006.










Emendamenti alla precedente uscita

Componenti forniti, Data di pubblicazione.

Data di pubblicazione

16 luglio 2020

Identificazione dei simboliv

	Codice Lotto		Conservazione		Numero catalogo
	Dispositivo medico di diagnosi in vitro		Produttore		Fragile
	eIFU - leggere le istruzioni prima dell'uso		Contiene sufficiente per <n> test		Da utilizzare entro il GG-MM-AAAA
SN	Numero di serie	R_X Only	Solo prescrizione medica		

HercepTest™ è un marchio registrato e soggetto a licenza di DakoCytomation, Denmark A/S
 Herceptin® è un marchio registrato di Genentech, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd.