

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System Kullanım Talimatları

Tamamen otomatikleştirilmiş, geliştirilmiş boyama sistemi Leica Biosystems' BOND'de kullanım için.

TA9145 Ürün Kodu, 60 testin (150 lam) boyanması için tasarlanmıştır:

HER2 Primary Antibody'li 60 test lamı

HER2 Negative Control'li 60 test lamı

15 HER2 Primary Antibody'li HER2 Control Slides

15 HER2 Primary Antibody'li pozitif dahili doku kontrolü



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

İçindekiler

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	4
Arka Plan	4
HER2 ekspresyonu	4
Klinik Konkordans Özeti	5
Prosedür Prensipleri	5
Sağlanan Komponentler	5
Kullanım Talimatları	6
Saklama ve Dayanıklılık	6
Numune Hazırlığı	6
Uyarılar ve Önlemler	7
Prosedür	7
A. Sağlanmayan ancak gerekli reagent'ler	7
B. Sağlanmayan ancak gerekli ekipman	7
C. Metodoloji	8
D. Lam Düzeni	8
E. Prosedür Adımları	9
Kalite Kontrol	10
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	11
Dahili Pozitif Kontrol Dokusu – HER2 Primary Antibody	11
Dahili Negatif Kontrol Dokusu Komponenti – HER2 Primary Antibody	11
Hasta Dokusu – HER2 Negative Control	12
Hasta Dokusu – HER2 Primary Antibody	12
Test Doğrulaması	12
Boyamanın Yorumlanması - Meme	12
Boyamanın Yorumlanması - Mide	13
Lam Tarama Sırası Rasyoneli	14
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	14
2. Dahili Pozitif Kontrol Dokusu – HER2 Primary Antibody	14
3. Dahili Negatif Kontrol Dokusu Komponenti – HER2 Positive Control	14
4. Hasta Dokusu – HER2 Negative Control kullanılarak boyanmış	14
5. Hasta Dokusu – HER2 Primary Antibody kullanılarak boyanmış	15
Sınırlamalar	15
A. Genel Sınırlamalar	15
B. Ürüne Özel Sınırlamalar	15
Hücre Hattı Verisi	16
Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest Klinik Konkordansı - Meme	16
2x2 Konkordans Sonuçları	17
3x3 Konkordans Sonuçları	18
Bond Oracle HER2 IHC System - PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Klinik Konkordansı - Meme	19
3x2 Konkordans Sonuçları	19
Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor Klinik Konkordansı - Mide	20
Sonuçlar -Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor - Mide	20
2x2 Konkordans Sonuçları	20
3x3 Konkordans Sonuçları	21
İmmünreaktivite – Normal Paneli	22

Tekrarlanabilirlik Çalışması	23
İçinde ve Arasında Hassasiyet Testi	23
A. Çalıştırma İçerisinde Hassasiyet Testi	23
B. Çalıştırma Arasında Hassasiyet Testi	23
C. Lot'a Lot Tekrarlanabilirliği	23
D. Laboratuvar Arasında Tekrarlanabilirlik	24
E. Gözlemciler Arasında Tekrarlanabilirlik	24
F. Enstrüman Arasında Hassasiyet (BOND-MAX - BOND-III)	25
Arıza Giderme	26
Referanslar	28

Kullanım Amacı

in vitro diagnostik kullanımı için

Bond Oracle HER2 IHC System, histolojik değerlendirme için işlenen meme kanseri dokusundaki ve mide adenokarsinomlarındaki (gastroözofageal bileşim dahil) HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) onkoprotein durumunu belirlemek için bir yarı sayısal immünohistokimyasal (IHC) testtir. Bond Oracle HER2 IHC System, Herceptin® (trastuzumab) tedavisinin göz önüne alındığı (bakınız Herceptin® prospektüsü) hastaların değerlendirilmesinde bir yardımcı olarak belirtilmektedir.

Not: Herceptin® klinik denemelerdeki hastaların tümü, bir araştırma aşamasındaki immünohistokimyasal Clinical Trial Assay (CTA) (Klinik Deneme Testi) kullanılarak seçilmiştir. Bu denemelerdeki hastaların hiçbiri, Bond Oracle HER2 IHC System kullanılarak seçilmemiştir. Bond Oracle HER2 IHC System, bağımsız bir örnek setinde Dako HercepTest™ ile karşılaştırılmış ve Klinik Konkordans Özeti'nde belirtildiği gibi kabul edilebilir uyumlu sonuçlar sağladığı bulunmuştur. Bond Oracle HER2 IHC System'in klinik bulguları ile gerçek korelasyonu belirlenmemiştir.

Herceptin® ileri mide kanseri (ToGA) klinik denemelerindeki tüm hastalar Dako Hercep Testi kullanılarak seçilmiştir. Bu denemelerdeki hastaların hiçbiri, Bond Oracle HER2 IHC System kullanılarak seçilmemiştir. Bond Oracle HER2 IHC System, bağımsız örnek grubunda Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor ile karşılaştırılmıştır ve Klinik Konkordans Özeti'nde (Mide) belirtildiği üzere kabul edilebilir ölçüde konkordant sonuçlar vermiştir. Bond Oracle HER2 IHC System'in klinik bulguları ile gerçek korelasyonu belirlenmemiştir.

Özet ve Açıklama

Arka Plan

Bond Oracle HER2 IHC System, mouse monoklonal anti-HER2 antikor, clone CB11 içerir. Corbett ve diğ. (1) tarafından geliştirilen ve Novocastra Laboratories Ltd (şimdi Leica Biosystems Newcastle Ltd) tarafından üretilen clone CB11, HER2 onkoproteinini dahil alanına karşı yönlendirilir.

Meme ve mide kanserli hastaların bir bölümünde, HER2 onkoproteinini malign transformasyon ve tümör progresyonu (2) sürecinin bir parçası olarak sentezlenmektedir. HER2 durumu da mide kanseri (3) tedavisinde önemli etkilere olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde bulunan onkoprotein HER2 aşırı ekspresyonu, bir şekilde HER2 anlaşılacağı toga deneme sonuçları açıkça kemoterapi ile birlikte mide kanserinde Herceptin® kullanımı HER2 genel sağkalım geliştirir etkili bir tedavi olduğunu göstermektedir iken, bir antikor bazlı terapi için hedef pozitif mide kanserleri (4). Herceptin® onkoprotein HER2 yüksek bir afinite ile bağlanır ve her ikisi de onkoprotein HER2 aşırı ifade eden insan tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir hümanize edilmiş bir monoklonal antikor, (5) in vitro ve in vivo olarak (6-8).

İlk immünperoksidad tekniğinden itibaren Nakane ve Pierce (9) tarafından rapor edildiği gibi yüksek hassaslıkla sonuçlanan pek çok gelişme, immünohistokimya alanında gözlemlenmiştir. En son gelişme, polimerik etiketlemenin kullanılması olmuştur. Bu teknoloji, primer antikorlara ve immünohistokimyasal tespit etme sistemlerine uygulanmıştır (10). Bond Oracle HER2 IHC System tarafından kullanılan Compact Polymer™ tespit etme sistemi, özellikle polimerik HRP bağlantılı antikor konjugatların hazırlanması için geliştirilmiş kontrollü polimerizasyon teknolojileri yeniliklerinin bir parçasıdır. Bu polimer teknolojisi, Oracle ürün yelpazesinde kullanıldığından streptavidin/biotin tespit etme sistemleri ile görülebilen nonspesifik endojen biotin boyama sorunu ortaya çıkmaz.

HER2 ekspresyonu

HER2 onkoprotein, çeşitli bölgelerden adenokanserlerinin % 20'sine kadar immünohistokimya tarafından tespit edilebilen düzeylerde ifade edilir. % 10 ve meme (11) invaziv duktal karsinom% 20 ve mide kanserlerinin (12-14)% 20 arasında onkoproteinini HER2 pozitif bulunmaktadır.Komodo tipi duktal kanser in situ (DCIS) vakalarının % 90'ı, meme paget hastalığının hemen tüm vakaları ile birlikte (15) pozitifdir (16).

Klinik Konkordans Özeti

Bond Oracle HER2 IHC System, Herceptin® klinik çalışmalarında kullanılan araştırma aşamasındaki Klinik Deneme Testi (CTA)'ya alternatif olarak sağlanmak için geliştirilmiştir. HER2 onkoprotein aşırı üretiminin belirlenmesi için Bond Oracle HER2 IHC System'in performansı, 431 meme tümörü numunelerinde Bond Oracle HER2 IHC System sonuçlarını Dako HercepTest ile karşılaştıran bağımsız bir çalışmada değerlendirilmiştir. Bu tümör numunelerinden hiçbiri, Herceptin® klinik denemelerindeki hastalardan elde edilmemiştir. Sonuçlar, iki testten sonuçlar arasında bir 2x2 analizde % 92.34 konkordans (% 89.42–94.67'lik % 95 güven aralıkları) ve bir 3x3 analizde % 86.54 konkordans (% 82.95–89.62'lik % 95 güven aralıkları) göstermiştir.

Mide adenokarsinomlarında (gastroözofageal bileşim dahil) HER2 onkoprotein aşırı üretiminin belirlenmesi için Bond Oracle HER2 IHC System performansı bağımsız bir çalışmada değerlendirilmiştir ve Çin orijinli 292 tümör numunesi üzerinde Bond Oracle HER2 IHC System sonuçları ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu tümör numunelerinden hiçbiri, Herceptin® klinik denemelerindeki hastalardan elde edilmemiştir. Sonuçlar, Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) testlerinin sonuçları arasında sırasıyla bir 2x2 analizde %95.12 konkordans (%91.95-97.31'lik %95 güven aralıkları) ve bir 3x3 analizde %89.90 konkordans (%85.81-93.13'lik %95 güven aralıkları) göstermiştir.

Prosedür Prensibi

Bond Oracle HER2 IHC System formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş dokular için bir immünohistokimyasal boyuma prosedürünü tamamlamak için gerekli komponentleri içerir. Kullanıma hazır HER2 Primary Antibody (clone CB11) ile inkübasyonun ardından bu sistem, kullanıma hazır Compact Polymer teknolojisini kullanır. Art arda eklenen kromojenin enzimatik konversiyonu, antijenik bölgede görünür bir reaksiyon ürününün formasyonu ile sonuçlanır. Sonrasında doku seksiyonları karşıt boyanır, dehidrate edilir, temizlenir ve takılır. Sonuçlar, ışık mikroskopi kullanılarak yorumlanır. Dört formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş human meme kanseri hücresi hattına sahip kontrol lamaları, boyama çalıştırmalarını doğrulamak için sağlanır. Dört hücre hattı 0, 1+, 2+ ve 3+ intensitelerinde HER2 onkoprotein ekspresyonunu belirtir. Bu hücre hatlarının boyama intensitesi, hücre başına HER2 onkoprotein reseptör yükü ve HER2 geni amplifikasyon durumu ile bağlantılıdır.

Bond Oracle HER2 IHC System (TA9145 ürün kodu) tamamen otomatikleştirilmiş, geliştirilmiş boyama sistemi Leica Biosystems' BOND'da kullanım içindir.

Sağlanan Komponentler

Aşağıda listelenen materyaller (Tablo 1), 150 lamın boyanması için yeterlidir (HER2 Primary Antibody ile inkübe edilmiş 60 test lamı, HER2 Negative Control ile inkübe edilmiş 60 ilgili test lamı, HER2 Primary Antibody ile inkübe edilmiş 15 HER2 Control Slides ve HER2 Primary Antibody ile inkübe edilmiş 15 dahili pozitif doku kontrolü). Test sayısı, lam başına 150 µL'lik bir otomatik dağıtımın kullanılmasına dayanır. Kit, maksimum 15 münferit BOND boyama çalıştırması için yeterli materyal sağlar.

HER2 Control Slides, (x15)	HER2 onkoprotein ekspresyonunu, sağlanan protokol ile uyumlu olarak boyandığında 0, 1+, 2+ ve 3+ boyama intensitelerinde gösteren formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş, human meme kanseri hücre hatlarının seksiyonları. Bu seksiyonlar tamamen yapışmıştır ve fırınlamaya gerek yoktur.
HER2 Primary Antibody, 13.5 mL	Kullanıma hazır, afinite pürifiye, mouse monoclonal IgG antikor, clone CB11 ve % 0.035 2-metilizotiazol-3(2H)-on içerir.
HER2 Negative Control, 9 mL	HER2 Primary Antibody ve % 0.035 2-metilizotiazol-3(2H)-on'ye eşit bir konsantrasyonda kullanıma hazır mouse IgG içerir.
Peroxide Block, 22.5 mL	% 3-4 hidrojen peroksid içerir.
Post Primary, 22.5 mL	% 10 (v/v) animal serum ve % 0.01 2-metilizotiazol-3(2H)-on içeren Tris-buffer salin içerisinde Rabbit anti-mouse IgG (<10 µg/mL).
Polymer, 22.5 mL	% 10 (v/v) animal serum ve % 0.01 2-metilizotiazol-3(2H)-on içeren Tris-buffer salin içerisinde Poly-HRP goat anti-rabbit IgG (<25 µg/mL).
DAB Part 1, 2.25 mL	Bir stabilizatör solüsyonda 66 mM 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid içerir.
DAB Part B (x2), 22.5 mL	≤% 0.1 (v/v) hidrojen peroksid içerir.
Hematoxylin, 22.5 mL	<% 0.1 hematoksilin içerir.

Tablo 1. Bond Oracle HER2 IHC System komponentleri

Kullanım Talimatları

Sağlanan tüm reagent'ler, özellikle bu test ile kullanılmak üzere formüle edilmiştir ve lot numaraları her Bond Oracle HER2 IHC System için spesifiktir. Testin geçerli olması için değişim yapılmamalıdır.

Saklama ve Dayanıklılık

2–8 °C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2–8 °C'ye dönün. Bu koşullardan sapma, testin geçersiz olmasına neden olacaktır. Kullanılan Bond Oracle HER2 IHC System'in, belirtilen son kullanma tarihleri arasında olduğundan emin olun. Bond Oracle HER2 IHC System'in kontaminasyon ve/veya instabilitesini belirten işaretler: solüsyon türbiditesi, koku gelişimi ve presipitatin mevcut olması. Yukarıda belirtilenlerin dışındaki saklama koşullarının kullanıcı tarafından kontrol edilmesi gerekir.

Numune Hazırlığı

Tüm numuneler, immünohistokimyasal boyama için dokunun muhafaza edilmesi amacıyla hazırlanmalıdır. Doku işleminin standart yöntemleri, tüm numuneler için kullanılmalıdır (17).

Dokuların formalinle fikse edilerek hazırlanması ve rutin olarak işleme alınması ve parafine gömülmesi önerilir. Örneğin rezeksiyon numuneler, 3–4 mm'lik bir kalınlıkla sınırlandırılmalı ve 18–24 saat için % 10 nötr tamponlu formalinde sabitlenmelidir. Dokular, bir alkol serisinde dehidrate edilmeli ve xylene ile temizlenmeli, ardından erimiş parafin mumu ile impregnasyon yapılmalı ve 60 °C'den daha yüksek sıcaklıkta tutulmamalıdır. Doku numuneleri, 3–5 µm arasında seksiyon haline getirmelidir.

HER2 onkoprotein değerlendirmesi ve tümör doğrulaması için gerekli lamların aynı anda hazırlanması gerekir. Antijenliği muhafaza etmek için lamlara takılan doku seksiyonları (Leica BOND

Plus Slides – ürün kodu S21.2113 veya Apex BOND Slides - ürün kodu 3800040), oda sıcaklığında (18–24 °C) seksiyonlamanın 4-6 haftasında boyanmalıdır. Seksiyonlamanın ardından lamaların 37 °C'de 12–18 saat (gece) için inkübe edilmesi önerilir. İlave adherans gerektiren seksiyonlar, bir saat daha 60 °C'de inkübe edilebilir.

ABD'de 1988'de getirilen Clinical Laboratory Improvement Act, 42 CFR 493.1259(b) altında "Laboratuvar tetkik tarihinden itibaren en az on yıl boyunca boyalı lamaları muhafaza etmeli ve tetkik tarihinden itibaren en az iki yıl boyunca numune bloklarını muhafaza etmelidir".

Uyarılar ve Önlemler

Sadece profesyonel kullanıcılar için.

Üründeki bir veya daha fazla komponent tehlikelidir.

Kural olarak 18 yaşın altındaki kişilerin bu ürünü kullanmalarına izin verilmez. Kullanıcıların doğru çalışma prosedürü, ürünün tehlikeli özellikleri ve gerekli güvenlik talimatları ile ilgili olarak dikkatli bir şekilde bilgilendirilmeleri gerekir.

ProClin™ 950 aşırı ekspozür semptomları, Oracle reagent'larda kullanılan prezervatif cilt ve göz iritasyonu ve muköz membranlarda ve üst solunum yolunda iritasyon içerebilir. Bu üründeki ProClin™ 950 konsantrasyonu, maksimum % 0.35 değerindedir. Bu solüsyonlar, tehlikeli bir madde için OSHA kriterlerini karşılamaz. Talep üzerine veya www.LeicaBiosystems.com'dan bir Material Safety Data Sheet kullanılabilir.

Fikse etme işleminden önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon yayabilecek gibi ele alınmalı ve doğru önlemler alınmalıdır.

Reagent'la asla ağızla pipetlenmemeli ve cildin ve muköz membranların reagent ve numunelerle temasından kaçınılmalıdır. Reagent veya numunelerin hassas alanlarla temas etmesi durumunda bu alanları bol su ile yıkayın. Doktora başvurun. Potansiyel tüm toksik komponentlerin imhası için federal, ulusal veya lokal düzenlemelere başvurun.

Reagent'ların mikrobiyal kontaminasyonunu minimize edin, aksi durumda nonspesifik boyamada bir artış ortaya çıkabilir.

Prosedür

A. Sağlanmayan ancak gerekli reagent'ler

- BOND Dewax Solution (ürün kodu AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (ürün kodu AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (ürün kodu AR9590)
- İmmünohistokimiyada kullanılan standart solventler (örn. etanol, absolut ve dereceli)
- Xylene (veya xylene benzerleri)
- Takma ortamı
- Distile veya deiyonize su

B. Sağlanmayan ancak gerekli ekipman

- Tamamen otomatikleştirilmiş Leica Biosystems' BOND-MAX ve BOND-III, gelişmiş boyama sistem(ler)i
- BOND Universal Covertiles (ürün kodu S21.2001, S21.4583 veya S21.4611)
- BOND Mixing Stations (ürün kodu S21.1971)
- Kurutma fırını, 60 °C sıcaklığı muhafaza edebilen
- Işık mikroskobu (4–40x objektif büyütme)
- Lamalar (Leica BOND Plus Slides – ürün kodu S21.2113 veya Apex BOND Slides - ürün kodu 3800040)
- Lameller

- BOND Slide Label & Print Ribbon (ürün kodu S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (ürün kodu CS9100)

C. Metodoloji

- Bu metodolojiyi izlemeden önce kullanıcıların, tamamen otomatik BOND immünohistokimyasal tekniklerde eğitilmiş olmaları gerekir.
- HER2 Primary Antibody ile boyanacak her test seksiyonu, HER2 Negative Control ile boyama için aynı seksiyonu gerektirecektir. Negatif kontrol seksiyonu, antijen bölgesinde spesifik ve nonspesifik boyama arasında diferansiyasyon sağlar. Her BOND boyama çalıştırması, bir HER2 Control Slide içermelidir. Boyama protokolünün sonunda hücre hatlarının, doğru boyama paternlerini göstermemesi durumunda (bakınız Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide) çalışma geçersiz olarak sayılmalıdır.

D. Lam Düzeni

Her lam için yeni bir BOND Universal Covertile (ürün kodu S21.2001, S21.4583 veya S21.4611) kullanılmalıdır. Önceden immünohistokimyasal veya in situ hibridizasyon boyama için kullanılan Leica BOND Universal Covertile'lerin kullanılması, bu test ile doğrulanmamıştır.

Lam tablası düzeni (Tablo 2), optimal Bond Oracle HER2 IHC System performansı ve elde edilecek tam 60 test sağlar.

Lam Pozisyonu	Lam Açıklaması	Reagent	Doku Tipi	Lam İkonu
1	Vaka 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Vaka 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Vaka 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Vaka 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Vaka 1	*HER2 Primary Antibody	Test	
6	Vaka 2	*HER2 Primary Antibody	Test	
7	Vaka 3	*HER2 Primary Antibody	Test	
8	Vaka 4	*HER2 Primary Antibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Pozitif	
10	Dahili Doku Kontrolü	*HER2 Primary Antibody	Pozitif	

Tablo 2. Doku tipini ve reagent'i gösteren lam tablası düzeni

E. Prosedür Adımları

Tablo 2'de açıklanan düzenle bir lam tablası oluşturmak için aşağıdaki adımları izleyin. Bu talimatlar, BOND System User Manual ile birlikte okunmalıdır.

1. BOND enstrümanında bulk ve tehlikeli atık konteynerlerinin, gerekli boyama çalıştırmalarının gerçekleştirilmesi için yeterli kapasitesi olduğundan emin olun.
2. Gerekli boyama çalıştırmalarının gerçekleştirilmesi için bulk reagent konteynerlerinde uygun alkol, distile veya deiyonize su, BOND Dewax Solution (kullanıma hazır olarak sağlanır), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (kullanıma hazır olarak sağlanır) ve BOND Wash Solution (x10 konsantre şekilde sağlanır) olduğundan emin olun.
3. Temiz bir BOND Mixing Station'ın yerleştirildiğinden emin olun.
4. Tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'u açın.
5. Tam otomatik BOND, gelişmiş boyama sisteme bağlı BOND kontrolör açın.
6. BOND yazılımını açın.
7. Yeni bir BOND Oracle HER2 BOND IHC System için reagent tabla barkodlarını, sistemi BOND reagent envanterine sokmak için el tarayıcısı ile tarayın.
8. Slide setup ekranına gidin ve **Add case** üzerine tıklayın.
9. İlk vaka için detayları girin. Dağıtım hacminin **150 µL** olarak ayarlandığından ve hazırlık protokolünün ***Dewax** olduğundan emin olun. OK üzerine tıklayın.
10. Slide setup ekranında vaka aktifken **Add slide** üzerine tıklayın.
11. Öncelikle hasta test lamları ekleyin. Doku tipinin **Test tissue** olarak ayarlandığından emin olun.
12. Dağıtım hacminin **150 µL** olarak ayarlandığını ve hazırlık protokolünün ***Dewax** olduğunu kontrol edin.
13. **Single** ve **Oracle** boyama modu değerlerini seçin (**Oracle control** üzerine tıklamayın).
14. **IHC** işlemini seçin.
15. İşaretleyici listesinden ***HER2 Negative Control** opsiyonunu seçin. Protocols sekmesinde varsayılan olarak doğru boyama protokolü (***IHC Protocol H**) ve HIER protokolü (***HIER 25 min with ER1 (97)**) mevcuttur.
16. **Add slide** üzerine tıklayın. Negatif kontrol reagent lamı oluşturulur.
17. Add slide iletişim kutusunda işaretleyici listesinden ***HER2 Primary Antibody** opsiyonunu seçin. Varsayılan protokoller ve tüm diğer ayarlar değişmez olarak kalır.
18. **Add slide** üzerine tıklayın. Test lamı oluşturulur.
19. Tüm vakalar ve hasta test lamları oluşturulana kadar 8 - 18 adımlarını tekrarlayın.
20. Sonrasında HER2 Control Slide'ı oluşturun. Bunu son vakaya ekleyin veya standart laboratuvar pratiklerinize bağlı olarak kontrol lamları için yeni bir vaka oluşturun.
Önemli not: Testin onaylanması için Bond Oracle HER2 IHC System için her çalıştırmaya (yani lam tablası) bir HER2 Control Slide dahil edilmesi bir gerekliliktir.
21. Add slide iletişim kutusunda doku tipini **Positive tissue** olarak ayarlayın.
22. **Oracle control** üzerine tıklayın.
23. **Lot No** listesinde HER2 Control Slide lot numarasını seçin. Lot numarası, lamın etiket alanına yazılıdır.
Önemli not: HER2 Control Slide, kullanılacak aynı Bond Oracle HER2 IHC System'den gelmelidir.

- 24.İşaretleyici listesinden ***HER2 Primary Antibody** opsiyonunu seçin. Dağıtım hacmini, boyama modunu, işlem ve protokol ayarlarını muhafaza edin.
- 25.HER2 Control Slide eklemek için **Add slide** üzerine tıklayın.
- 26.Son olarak, bir pozitif dahili doku kontrol lamı ekleyin.
- 27.**Oracle control** seçimini kaldırın.
- 28.İşaretleyici listesinden ***HER2 Primary Antibody** opsiyonunu seçin. Dağıtım hacmini, boyama modunu, işlem ve protokol ayarlarını muhafaza edin. Doku tipi **Positive tissue** olarak kalır.
- 29.**Add slide** üzerine tıklayın. Bu, lam oluşumunu tamamlar.
- 30.Lam etiketlerini yazdırın. Tüm Oracle lam etiketlerinin üzerinde "OC" yazılıdır. HER2 Control Slide etiketi, Bond Oracle HER2 IHC System lot numarasını da içerir.
- 31.Lamları uygun şekilde etiketleyin.
- 32.Tüm Bond Oracle HER2 IHC System konteynerlerinin kapaklarını açın ve reagent tablasını BOND'a yükleyin.
- 33.Lamları D bölümü, Tablo 2'de belirtilen sırada lam tablası üzerine yerleştirin. Yeni Covertiles uygulayın.
- 34.Lam tablasını BOND'a yükleyin ve **Load/Unload** tuşuna basın.
- 35.Lamların taranmış olduğunu kontrol edin ve Sistem durum ekranındaki **Run (Play)** tuşuna tıklayın.
- 36.Tabla gösterge alanında **Proc (OK)** ve seri numarası ile sonlanma saatinin görüntülediğinden emin olun.
- 37.Çalıştırma tamamlandığında **Load/Unload** tuşuna basın ve lam tablalarını BOND'dan kaldırın.
- 38.Covertiles kaldırın ve lamları deiyonize suda yıkayın.
- 39.Seksiyonları dehidrate edin, temizleyin ve takın.

Kalite Kontrol

Kullanıcı laboratuvarında doku fikse etme, işleme ve gömme işlemlerindeki farklılıklar, sonuçlarda da belirgin farklılıklara neden olabilir ve bu nedenle Bond Oracle HER2 IHC System'de Leica Biosystems' tarafından sağlanan HER2 Control Slides'a ek olarak dahili kontrollerin düzenli performansını gerektirir. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry kalite kontrol talimatlarına başvurun; ayrıca bakınız CLSI (önceden NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) ve Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18). Ayrıca, immünohistokimyasal kalite kontrol tipleri ve amaçları için aşağıdaki Tablo 3'e bakın.

Örnek*	Açıklama	HER2 Primary Antibody Boyama	HER2 Negative Control Boyama
HER2 Control Slide	Bond Oracle HER2 IHC System'de sağlandığı gibi.	Boyama prosedürünü kontrol eder ve reagent performansının geçerliliğini belirtir.	Nonspesifik arka plan boyamanın tespit edilmesi
Dahili Pozitif Kontrol Dokusu	Hedef antijeni içeren doku. İdeal kontrol, primer antikor hassaslığındaki hafif değişiklikleri belirleyecek şekilde zayıf pozitif boyama dokusudur.	Analizdeki tüm adımları kontrol eder. Doku hazırlamayı ve Bond Oracle HER2 IHC System boyama performansını doğrular.	
Dahili Negatif Kontrol Dokusu Komponenti	Negatif olması beklenen dokular veya hücreler (hasta dokusunda veya pozitif/negatif kontrol dokusu bileşenlerinde yer alabilir).	Hücreler/selüler bileşenlerle çapraz reaksiyonlu nonspesifik antikorun tespit edilmesi.	

*Hasta örneği başına fikse edilmiş ve işlenmiş

Tablo 3. İmmünohistokimyasal kalite kontrolleri ve amaçları

Kontrol dokusu, mümkün olan en kısa sürede ve hasta örneği (örnekleri) ile aynı şekilde formalinle fikse edilmiş, işlenmiş ve parafine gömülmüş biyopsi veya cerrahi numune olmalıdır. Numuneler, uygun şekilde immünohistokimyasal boyama için doku antijenliğinin muhafaza edilmesini amaçlıya ele alınmalıdır. Doku işleme standart yöntemleri, tüm numuneler için kullanılmalıdır (17).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Sağlanan HER2 Control Slides her biri 0, 1+, 2+ ve 3+ boyama intensite skorlarına sahip dört formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş human meme kanseri hücre hattı çekirdeği içerir. Bir lam, her test çalıştırmasına (yani lam tablası) dahil edilmelidir. Leica Biosystems' tarafından sağlanan doğru HER2 Control Slide değerlendirmesi, testin geçerliliğini belirtir (bakınız Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Bu sistemle sağlanan HER2 Control Slides, sadece reagent performansını doğrular ve doku hazırlığını kontrol etmez.

Dahili Pozitif Kontrol Dokusu – HER2 Primary Antibody

Dahili pozitif kontrol dokusu bileşenleri kullanılmışsa bunlar, mümkün olan en kısa sürede ve hasta örneği (örnekleri) ile aynı şekilde formalinle fikse edilmiş, işlenmiş ve gömülmüş biyopsi veya cerrahi numune olmalıdır. Pozitif doku kontrolleri, doğru şekilde hazırlanmış dokular ve geçerli boyama teknikleri için belirleyicidir. Her test çalıştırma için en az bir pozitif kontrol bileşeni dahil edilmelidir. Pozitif kontrol sekiyonu, primer antikor hassaslığındaki hafif değişiklikleri belirleyecek şekilde zayıf pozitif boyamayı göstermelidir.

Not: Bilinen pozitif kontrol dokusu bileşenleri sadece, test reagent'leri ile birlikte işlenen dokuların doğru performansın izlenmesi için kullanılmalıdır ANCAK hasta örneklerinin spesifik yorumlanmasının formüle edilmesine bir yardımcı olarak kullanılmaz. Pozitif kontrol dokusu, uygun pozitif boyamayı göstermezse hasta numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

Tümü 4 HER2 derecelerini gösteren tümörlerden oluşan bir multi doku kontrol bloğu da, dahili kontrol materyaline uygun şekilde etkin olarak kullanılabilir.

Dahili Negatif Kontrol Dokusu Komponenti – HER2 Primary Antibody

Dahili negatif kontrol bileşenleri kullanılmışsa bunlar, mümkün olan en kısa sürede ve hasta örneği (örnekleri) ile aynı şekilde formalinle fikse edilmiş, işlenmiş ve gömülmüş taze biyopsi

veya cerrahi numune olmalıdır. HER2 onkoprotein negatif olarak bilinen kontrol dokusunun her boyama çalıştırması ile kullanılması, primer antikorun spesifitesini kontrol eder ve nonspesifik arka plan boyaması için bir bildirim sağlar. Pek çok doku seksiyonunda bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, dahili negatif kontrol bölgeleri sağlar (bu, kullanıcı tarafından kontrol edilmelidir). Tümörle bağlantılı olmayan normal meme kanalları, testin geçerliliği için bir referans sağlayabilir. Spesifik boyamanın, dahili negatif kontrol dokusunda ortaya çıkması durumunda hasta numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

Tüm dört HER2 gradı gösteren multi doku kontrol bloğunun kullanılması, negatif ve pozitif kontrol dokusu amacıyla kullanılabilir.

Hasta Dokusu – HER2 Negative Control

Antijenik bölgede nonspesifik boyamanın değerlendirilmesi ve spesifik HER2 onkoprotein boyamanın kesin yorumlanmasını sağlamak amacıyla her hasta testi için ilgili bir seksiyonda HER2 Primary Antibody'nin yerine sağlanan HER2 Negative Control'ü kullanın.

Hasta Dokusu – HER2 Primary Antibody

Pozitif boyama intensitesi, HER2 Negative Control ile nonspesifik arka plan boyama kapsamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir immünohistokimyasal test ile negatif bir sonuç, antijenin tespit edilmediği anlamına gelir; antijenin test edilen hücrelerde/dokuda mevcut olmadığı anlamına gelmez. Bond Oracle HER2 IHC System immünreaktivitesi ile ilgili spesifik bilgiler için **Lam Tarama Sırası Rasyoneli, Sınırlamalar, Performans Değerlendirmesi ve Immünreaktivite**'ye bakınız.

Test Doğrulaması

Bir diagnostik prosedüründe herhangi bir antikor veya boyama sisteminin ilk kullanımından önce kullanıcının, antikor spesifitesini bilinen immünohistokimyasal pozitif ve negatif profilleri ile bir dahili doku serisinde test ederek kontrol etmesi gerekir. Önceden ana hatları çizilen **Kalite Kontrol**'e ve CAP Certification Program for Immunohistochemistry ve/veya CLSI (önceden NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) kalite kontrol gereksinimlerine bakınız. Bu kalite kontrol prosedürleri, her yeni antikor lotu için veya test parametrelerinde değişiklik olduğunda tekrarlanmalıdır. 0 - 3+ bilinen HER2 onkoprotein boyama intensitelerine sahip human invazif (infiltratif) duktal meme kanseri ve diğer uygun negatif dokular, test doğrulaması için uygundur.

Boyamanın Yorumlanması - Meme

HER2 onkoprotein ekspresyonunun belirlenmesi için sadece membran boyama paterni ve intensitenin, Tablo 4'te verilen skala kullanılarak değerlendirilmesi gerekir. Bir aydınlık alan mikroskobu kullanan bir patolojistin, lam değerlendirmesini gerçekleştirmesi gerekir. Immünohistokimyasal boyama ve skorlamanın değerlendirilmesi için 10x büyütmeye sahip bir objektif uygundur. 20–40x objektif büyütmesinin kullanılması, skorun onaylanmasında gereklidir. Sitoplazmik boyama, nonspesifik boyama olarak ele alınmalı ve membran boyama intensitesi değerlendirmesine dahil edilmemelidir (19). 0, 1+, 2+ ve 3+ boyama diferansiyasyonuna yardım amacıyla boyama intensitelerinin temsili imajları için Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide'a bakınız. Sadece invazif meme kanserli hastalardan alınan numuneler sayılmalıdır. Aynı numunede *in situ* kanserli ve invazif kanserli vakalarda sadece invazif komponent sayılmalıdır.

İmmünohistokimyasal Boyama Paterni	Skor	Değerlendirme
Boyama gözlemlenmez veya membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan daha az oranda gözlemlenir.	0	Negatif
Soluk/zor fark edilebilir membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan daha fazla oranda tespit edilir. Hücreler sadece, membran kısımlarında boyanır.	1+	Negatif
Zayıf - moderat komplet membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan fazlasında gözlemlenir.	2+	Belirsiz (Zayıf Pozitif)
Güçlü komplet membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan daha fazla oranda gözlemlenir.	3+	Güçlü Pozitif

Tablo 4. HER2 boyamanın yorumlanması

Bond Oracle HER2 IHC System boyama sonuçları, 0 ve 1+ boyama intensitesi skorlarına sahip HER2 onkoprotein ekspresyonu için negatif, 2+ boyama intensitesi skoru ile belirsiz (zayıf pozitif) ve 3+ boyama intensitesi skoru ile güçlü pozitif olarak yorumlanır. Bond Oracle HER2 IHC System, hasta ve/veya hekime prognostik bilgi sağlamak için tasarlanmamıştır ve bu amaçla doğrulanmamıştır. Her boyama değerlendirmesi için lamaların, boyama çalıştırması geçerliliğinin belirlenmesi ve örnek dokunun boyama intensitesinin yarı sayısal değerlendirmesinin etkinleştirilmesi için aşağıda yer alan sırada incelenmesi gerekir.

Boyamanın Yorumlanması - Mide

HER2 onkoprotein ekspresyonunun belirlenmesi için sadece membran boyama paterni ve intensitenin, Tablo 5 ve 6'da verilen skala kullanılarak değerlendirilmesi gerekir. Bir aydınlık alan mikroskobu kullanan bir patolojistin, lam değerlendirmesini gerçekleştirmesi gerekir. İmmünohistokimyasal boyama ve skorlamanın değerlendirilmesi için 10x büyütmeye sahip bir objektif uygundur. 20–40x objektif büyütmesinin kullanılması, skurun onaylanmasında gereklidir. Sitoplazmik boyama, nonspesifik boyama olarak ele alınmalı ve membran boyama intensitesi değerlendirmesine dahil edilmemelidir (15). 0, 1+, 2+ ve 3+ boyama diferansiyasyonuna yardım amacıyla boyama intensitelerinin temsili imajları için Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide'a bakınız. Yalnızca mide veya gastroözofageal bileşim adenokarsinomları bulunan hastalardan alınan numuneler sayılmalıdır.

Cerrahi Numuneler	İmmünohistokimyasal Boyama Paterni	Skor	Değerlendirme
	Boyama gözlemlenmez veya membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan daha az oranda gözlemlenir.	0	Negatif
	Soluk/zor fark edilebilir membran boyama, tümör hücrelerinin % 10'undan daha fazla oranda tespit edilir. Hücreler sadece, membran kısımlarında boyanır.	1+	Negatif
	Zayıf - moderat komplet bazolateral veya lateral membran boyama, tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında gözlemlenir.	2+	Belirsiz (Zayıf Pozitif)
	Güçlü komplet bazolateral veya lateral membran boyama, tümör hücrelerinin %10'undan daha fazla oranda gözlemlenir.	3+	Güçlü Pozitif

Tablo 5. Mide kanseri cerrahi numunelerinde HER2 boyamanın yorumlanması

Biyopsi Numuneleri	İmmünohistokimyasal Boyama Paterni	Skor	Değerlendirme
	Hiçbir tümör hücresinde boyama gözlemlenmedi	0	Negatif
	Boyanan hücre yüzdesinden bağımsız olarak zayıf/zor tespit edilen membran boyamalı tümör hücre kümesi gözlemlendi	1+	Negatif
	Boyanan hücre yüzdesinden bağımsız olarak zayıf - moderat komplet bazolateral veya lateral membran boyamalı tümör hücre kümesi gözlemlendi	2+	Belirsiz (Zayıf Pozitif)
	Boyanan hücre yüzdesinden bağımsız olarak güçlü komplet bazolateral veya lateral membran boyamalı tümör hücre kümesi gözlemlendi	3+	Güçlü Pozitif

Tablo 6. Mide kanseri biyopsi numunelerinde HER2 boyamanın yorumlanması

Bond Oracle HER2 IHC System boyamalı biyopsilerin yorumlanması için en az beş tümör hücre kümesi tavsiye edilir.

Lam Tarama Sırası Rasyoneli

Lamların, aşağıdaki sırada taranması gerekir:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Oracle HER2 Control Slide ile geçerli bir test aşağıdakileri gösterir:

- 3+ Kontrol Hücresi Hattı SK-BR-3'te güçlü kararmış komplet hücre membranı boyamasının mevcut olması.
- 2+ Kontrol Hücre Hattı, MDA-MB-453'te zayıf - moderat kararmış, komplet hücre membran boyamasının mevcut olması.
- 1+ Kontrol Hücre Hattı, MDA-MB-175'te soluk/zor fark edilebilir kararmış, inkomplet hücre membran boyamanın mevcut olması.
- 0 Kontrol Hücresi Hattı MDA-MB-231'de boyama yok.

Önemli not: MDA-MB-175 1+ kontrol hücresi hattının bir özelliği, hücre formu yığılımlarının olduğu karakteristik bir büyüme paternidir. Bu yığılımlar, hücre yığılımı boyunca sürekli bir luminal fırçamsı kenarlı bölgede artış sağlar. Bu fırçamsı kenarlı boyama, hücre membranının geri kalanından daha güçlü olacaktır. Doğru HER2 onkoprotein 1+ boyama paterni, soluk/zor fark edilebilir inkomplet hücre membranı boyamasıdır. Sitoplazma içerisindeki golgi bölgesinin dot-like immünohistokimyasal boyaması, bu hücre hattında da gözlemlenebilir.

2. Dahili Pozitif Kontrol Dokusu – HER2 Primary Antibody

Kararmış membran boyamanın MEVCUT OLMASI, seçilen pozitif kontrolün bilinen HER2 onkoprotein durumuna göre gözlemlenmelidir.

3. Dahili Negatif Kontrol Dokusu Komponenti – HER2 Positive Control

Membran boyamanın MEVCUT OLMAMASI gözlemlenmelidir. Bir negatif kontrol dokusu komponenti, özellikle hedeflenen hücre/selüler komponentlerle çapraz reaksiyonlu tespit etme sisteminin eksikliğini onaylar. Membran boyamanın, bir negatif kontrol dokusu komponentinde ortaya çıkması durumunda hasta numunesi ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

4. Hasta Dokusu – HER2 Negative Control kullanılarak boyanmış

Membran boyamanın MEVCUT OLMAMASI, primer antikor tarafından hedef antijenin spesifik etiketlemesini doğrular. HER2 Negative Control ile tedavi edilmiş numunenin sitoplazmasında

oluşan diğer kararmış boyama, örn. bağ dokusunda, lökositlerde, eritrositlerde veya nekrotik dokuda, nonspesifik arka plan boyaması olarak ele alınmalı ve not edilmelidir.

5. Hasta Dokusu – HER2 Primary Antibody kullanılarak boyanmış

HER2 onkoprotein ekspresyon seviyeleri, Tablo 4-6 ve Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide altında belirlenen kriterler tarafından belirlenir.

Sınırlamalar

A. Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya, histopatolojik özelliklerin yorumlanması ve belirlenmesine yardımcı olmak için kullanılan laboratuvar tabanlı bir multi adımlı tekniktir. Bu, prosedürün (uygun reagent, doku, fikse etme, işleme ve IHC lam hazırlığının seçilmesi dahil) ve yorumlamanın her durumunda uzmanlık eğitimi gerektiren bir tekniktir.

Dokunun immünohistokimyasal boyaması, boyama işleminden önce dokunun ele alınması, fikse edilmesi ve işleme alınmasına bağlıdır. Diğer dokularla veya akışkanlarla hatalı fikse etme, dondurma, eritme, yıkama, kurutma, ısıtma, seksiyonlama veya kontaminasyon artefak, antikor trapping veya yanlış negatif sonuçlar oluşturabilir. Doku içerisinde fikse etme, gömme yöntemleri veya inherent aksaklıklar nedeniyle tutarsız sonuçlar ortaya çıkabilir (21). Aşırı veya yetersiz karşıt boya da sonuçların doğru yorumlanmasına engel olabilir.

Mevcutsa nonspesifik boyama, genelde bir difüz görünüme sahiptir. Bağ dokusu sporadik boyama, aşırı formalinle fikse edilmiş dokulardan seksiyonlarda da gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanılır. Nekrotik veya dejeneren hücreler, genelde belirsiz şekilde boyanır (22). Yanlış pozitif sonuçlar, substrat reaksiyon ürünleri veya proteinlerin immünohistokimyasal olmayan protein bağlanması nedeniyle görülebilir. Bunlar, kullanılan immünohistokimyasal boyamanın tipine bağlı olarak psödoperoksidad (eritrositler) veya endojen peroksidad (sitokrom C) gibi endojen enzimler nedeniyle de ortaya çıkabilir.

Hepatit B virüsü ile enfekte hastalardan alınan ve Hepatit B virüsü yüzey antijeni (HBsAg) içeren dokular, horseradish peroksidadlı nonspesifik boyama (23) ortaya koyabilir.

Beklenmedik immünohistokimyasal boyama veya boyamadaki varyasyonlar, kodlama genlerinin veya antijenlerin ekspresyon seviyelerindeki alterasyonların bir sonucu olabilir. Tahmin edilen boyama paternlerindeki herhangi bir değişiklik, tüm diğer diagnostik tetkikleri ile birlikte yorumlanmalıdır.

İmmünohistokimyasal boyamanın yorumlanması, morfolojik çalışmalarla ve uygun kontrol materyalinin kullanımı ile tamamlanmalıdır ve hastanın klinik geçmişi ve diğer diagnostik testler kapsamında kalifiye bir patolojist tarafından değerlendirilmelidir.

Testin performansı (yani pozitif ve negatif kontrollerin uygunluk değerlendirmesi) ve boyama olmasının veya olamamasının yorumlanması, uygun şekilde ruhsatlandırılmış/ lisanslanmış bir laboratuvarında immünohistokimyasal testin tüm değerlendirmesinden ve yorumlanmasından sorumlu uygun vasıflara sahip ve deneyimli bir patolojistin gözetiminde gerçekleştirilmelidir.

B. Ürüne Özel Sınırlamalar

Bu ürün, akış sitometrisinde kullanılmak üzere tasarlanmamıştır. Performans özellikleri, akış sitometrisi için belirlenmemiştir.

Yanlış negatif sonuçlar, doku seksiyonunda antijen degradasyonunun bir sonucu olarak görülebilir. HER2 onkoprotein değerlendirmesi ve tümör doğrulaması için gerekli lamların aynı anda hazırlanması gerekir. Antijenliği muhafaza etmek için lamlara takılan doku seksiyonları (Leica BOND Plus Slides – ürün kodu S21.2113 veya Apex BOND Slides - ürün kodu 3800040), oda sıcaklığında (18–24 °C) seksiyonlamanın 4-6 haftasında boyanmalıdır. Seksiyonlamanın ardından lamların 37 °C'de 12–18 saat için inkübe edilmesi önerilir. Daha fazla adherans gerektiren seksiyonlar, bir saat daha 60 °C'de inkübe edilebilir.

İmmünohistokimyasal profilin minimum naturel varyasyonu, Bond Oracle HER2 IHC System'de kullanılan hücre hatlarının büyüme serileri arasında görülecektir. Bu naturel varyasyon, biyolojik bir entitinin kabul edilebilir tolerans seviyeleri arasındadır ve sistemin performansını veya yorumlamayı etkilemez.

Tablo 7’te belirtilen akış sitometrisi ve in situ hibridizasyonu kullanan hücre hattı karakterizasyonu da naturel biyolojik varyasyona konudur. Flüoresan in situ hibridizasyonu tarafından değerlendirildiği gibi kontrol hücre hatlarının teknik ve yorumsal varyasyonu da rapor edilir (24). HER2 Control Slides değerlendirmesi, tüm ilgili son kullanma tarihlerini dikkate almalıdır. Bond Oracle HER2 IHC System’i 2–8 °C’de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2–8 °C’ye dönün. Bu koşullardan sapma, testin geçersiz olmasına neden olacaktır.

Bond Oracle HER2 IHC System reagent’lerini, Leica Biosystems veya diğer üreticiler tarafından sağlanan diğer komponentlerle değiştirmeyin. Bunun yapılması, testi geçersiz kılacaktır.

C - E (Prosedür) bölümlerinde genel hatları çizilen adımların tümünün, belirtilen sırada gerçekleştirilmesi önemlidir. Bu sıradan sapma, testin geçersiz olmasına neden olacaktır.

Testte sadece formalinle fikse edilmiş dokuların kullanılması önemlidir. Başka bir fikse etme tipinin kullanılması, testi geçersiz kılacaktır.

Önerilen kalınlık aralığının dışında kesilmiş doku seksiyonları doğrulanmamıştır. Başka bir seksiyon kalınlığının kullanılması, testi geçersiz kılabilir.

Hücre Hattı Verisi

Hücre Hattı	BOND Oracle HER2 IHC System Profili	Hücre başına HER2 Reseptör Yükü*	HER2 Geni Amplifikasyon Durumu*	
			HER2 Kopya Numarası	HER2:Chr17 Gen Oranı
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

*Akış sitometrisi tarafından değerlendirildiği gibi HER2 reseptör yük analizi. * FISH dual prob tarafından değerlendirildiği gibi HER2 Geni Amplifikasyon Durumu (HER2: Kromozom 17).

Tablo 7. HER2 Control Slide profili

Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest Klinik Konkordansı - Meme

Çalışmanın birinci kısmı, Bond Oracle HER2 IHC System’in Herceptin® (trastuzumab) tedavisi ile tedavinin belirlenmesinde bir yardımcı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Çalışma, bu test için ‘altın standart’ olarak ele alınan Dako HercepTest ve Bond Oracle HER2 IHC System arasında konkordansın incelenmesi için tasarlanmıştır. Kabul kriteri, % 95’lik bir güven aralığında (CI) iki test arasında toplam % 75 konkordanstan daha büyük olacak şekilde belirlenmiştir.

Çalışma iki bölge, US tabanlı, karışık bir değerlendirme olarak gerçekleştirilmiştir. Her araştırma aşamasındaki bölge, bilinen HER2 durumunun formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş meme kanseri örnekleri ile birlikte sağlanır. Vakalar, klinik test için bir histopatoloji departmanına doğru art arda vaka akışı gösteren klinik arşivlerden art arda tersi sırada seçilmiş ve diğer prognostik ve/veya prediktif faktörlerden bağımsız şekilde kohorta bias olmadan test edilmiştir. 160 ve 292 numunelik kohortlar, sırasıyla Bölge 1 ve Bölge 2’de test edilmiştir. Her kohort, 452 örnekten oluşan bir toplam çalışma popülasyonu ile sonuçlanan önceden atanmış HER’ IHC skorlarına dayanan eşit bir belirsiz/pozitif (2+, 3+) ve negatif (0, 1+) vakaların bir gösterimine sahip olmuştur. Yirmi örnek, yeterli invazif tümör olmaması nedeniyle uygunsuz olarak ele alınmış ve çalışmadan kaldırılmıştır. Diğer dokuz örnek, lam yüzeyinden kaldırılan dokunun bir sonucu olarak çalışmamıştır ve 431 örnekten oluşan bir çalışma popülasyonu ile sonuçlanmıştır.

Tüm vakalar, prospektüste belirtilen üretici talimatlarına uygun şekilde HercepTest ile boyanmıştır.

Her vakadan sekansiyel seksiyonlar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi Leica Biosystems' BOND'daki Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır. Tüm vakalar, benzersiz hasta tanımlama bilgisi ile bağlantısı kesilmiş ve tümör boyutu, tümör evresi, tümör derecesi ve östrojen reseptör durumu ile ilgili klinik veriler ile birlikte olmuştur.

Boyanan tüm lamalar, iki bölgede eğitimli gözlemciler tarafından randomize bir şekilde sayılmış ve maskelenmiştir. 2x2 konkordans analizi için skorlar, boyama intensitesinin 0 veya 1+ olması durumunda negatif ve 2+ veya 3+ skorları için pozitif olarak yorumlanmıştır. 3x3 konkordans analizi için skorlar, boyamanın 0 veya 1+ olması durumunda negatif, 2+ skorları için belirsiz ve 3+ skorları için pozitif olarak yorumlanmıştır. Daha sonrasında veri pozitif boyama anlaşması ve negatif boyama anlaşması için analiz edilmiştir.

2x2 Konkordans Sonuçları

Bu primer analizde iki testten (Bond Oracle HER2 IHC System ve Dako HercepTest) alınan test sonuçları, negatif (0,1+) veya pozitif (2+, 3+) olarak kategorize edilmiştir. Olası dört kombinasyonun frekansları, bir 2x2 tablo formatında görüntülenir (bakınız Tablo 8). Sonrasında bu 2x2 tablosunu baz alan toplam konkordans oranı, tam bir % 95 güven aralığı ile hesaplanmıştır (binom dağılımı baz alınır).

Başarı kriterlerinin zıt olduğu sıfır hipotezinde (H_0) konkordans % 75'ten büyük değildir.

Bir 2x2 analizde iki test arasındaki 431 örnek için gözlemlenen sözleşme, % 89.42 - % 94.67'lik bir % 95 CI ile % 92.34'lük (398/431) bir konkordans gösterir. Bu veri, sözleşmenin bir p değeri < 0.0001 ile % 75'ten daha büyük olmadığı sıfır hipotezinin (H_0) reddedilmesini destekler.

Pozitif Sözleşme (hassaslık) yüzdesi veya Bond Oracle HER2 IHC System'in HercepTest pozitif vakalarını doğru şekilde tanımlama yeteneği (tüm HercepTest pozitif vakaları dışında Bond Oracle HER2 IHC System ve HercepTest tarafından pozitif olarak sayılmış numunelerin yüzdesi) % 78.17 - % 90.16'lık bir % 95 CI ile % 84.87 (129/152) idi. Negatif Sözleşme (spesifite) yüzdesi veya testin HercepTest negatif pozitif vakalarını doğru şekilde tanımlama yeteneği (tüm HercepTest negatif vakaları dışında Bond Oracle HER2 IHC System ve HercepTest tarafından negatif olarak sayılmış numunelerin yüzdesi) % 93.51 - % 98.27'lik bir % 95 CI ile % 96.42 (269/279) idi.

		HercepTest		
		Negatif	Pozitif	Toplam
Bond Oracle HER2 IHC System	Negatif	269	23	292
	Pozitif	10	129	139
	Toplam	279	152	431

2x2 Konkordans (% 95 CI) = % 92.34 (% 89.42 - 94.67); p<0.0001

Tablo 8. Hercep Test'li Bond Oracle HER2 IHC System 2x2 Konkordansı

3x3 Konkordans Sonuçları

Veri, 3x3 analiz için negatif (0 veya 1+), belirsiz (2+) veya pozitif (3+) olarak gruplanmış ve % 82.95 - % 89.62'lik bir % 95 CI ile % 86.54'lük (373/431) bir konkordans göstermiştir. Bu nedenle, sözleşmenin bir p değeri < 0.0001 ile % 75'ten daha büyük olmadığı sıfır hipotezi (H_0) reddedilmiştir.

3+ için Pozitif Sözleşme yüzdesi (tüm 3+ HercepTest pozitif vakaları dışında Bond Oracle HER2 IHC System ve HercepTest tarafından 3+ pozitif olarak sayılmış numunelerin yüzdesi) % 62.97 - % 82.11'lik bir % 95 CI ile % 73.33 (66/90) idi. Negatif Sözleşme yüzdesi, % 93.51 - 98.27'lik bir % 95 CI ile % 96.42 (269/279) idi. Bakınız Tablo 9.

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

3x3 Konkordans (% 95 CI) = % 86.54 (% 82.95 - 89.62); $p < 0.0001$

Tablo 9. Hercep Test'li Bond Oracle HER2 IHC System 3x3 Konkordansı

Sonuç olarak bu çalışmada oluşturulan veri, Bond Oracle HER2 IHC System'in HercepTest ile yüksek konkordansına dayanarak Herceptin® (trastuzumab) tedavisi için tedavi belirlemede bir yardımcı olarak kullanılabileceğini gösterir.

Bond Oracle HER2 IHC System - PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Klinik Konkordansı - Meme

Çalışmanın 2. kısmı, Bond Oracle HER2 IHC System ile HER2 immünohistokimya ile bağlantılı olarak kullanılan gen değerlendirilmesi refleks testi için 'altın standart' olarak ele alınan Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit arasındaki konkordansın incelenmesi için tasarlanmıştır.

Bu çalışma, araştırma aşamasındaki aynı bölgelerde gerçekleştirilmiştir ve Kısım 1'deki ile aynı çalışma kohortunu kullanmıştır. Tüm vakalar Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit ile prospektüste belirtildiği gibi üreticinin kullanım talimatlarına uygun şekilde boyanmıştır. Her vakadan sekansiyel seksiyonlar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'daki Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır (klinik çalışmanın Kısım 1'inden). Boyanan 431 vakadan yetersiz prob hibridizasyonu nedeniyle üç okazyonda sonuç elde edilmemiştir ve 428 vakanın toplam bir kohortu ortaya çıkmıştır.

Boyanan tüm lamalar, iki araştırma aşamasındaki bölgede eğitimli gözlemciler tarafından sayılmıştır. 3x2 konkordans analizi için skorlar, 20'lik bir tümör hücresi sayımının ardından HER2/CEP17 gen amplifikasyon oranının (<) 2.0'dan düşük olması durumunda negatif ve (>) 2.0'dan büyük veya eşit olması durumunda pozitif olarak yorumlanmıştır.

3x2 Konkordans Sonuçları

Bir 3x2 analizde iki test arasındaki 428 örnek için gözlemlenen sözleşme, % 84.1 - % 90.6'lık bir % 95 CI ile % 87.6'lık (375/428) bir konkordans gösterir.

Pozitif Sözleşme (hassaslık) yüzdesi veya Bond Oracle HER2 IHC System'in PathVysion pozitif vakalarını doğru şekilde tanımlama yeteneği (tüm PathVysion pozitif vakaları dışında Bond Oracle HER2 IHC System ve PathVysion tarafından pozitif olarak sayılmış numunelerin yüzdesi) % 86.8 - % 97.4'lük bir % 95 CI ile % 93.8 (61+30/97) idi.

Negatif Sözleşme (spesifite) yüzdesi veya testin PathVysion negatif pozitif vakalarını doğru şekilde tanımlama yeteneği (tüm PathVysion negatif vakaları dışında Bond Oracle HER2 IHC System ve PathVysion tarafından negatif olarak sayılmış numunelerin yüzdesi) % 81.6 - % 89.2'lik bir % 95 CI ile % 85.8 (284/331) idi. Bakınız Tablo 10.

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

Toplam Konkordans (% 95 CI) = % 87.6 (% 84.1 – 90.6)

Tablo 10. Bond Oracle HER2 IHC System boyama v PathVysion HER-2 DNA Probe kit 3x2 konkordansı.

Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor Klinik Konkordansı - Mide

Çalışmanın 3. Bölümünün amacı sabit formalinli, parafin gömülü ileri evredeki kanser numunelerinden veri elde etmek ve Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor kullanılarak BOND tam otomatik gelişmiş boyama sisteminde tam otomatik Bond Oracle HER2 IHC System konkordansını incelemektir. Üçüncü bölümün kabul kriteri, iki test arasında %75'in üzerinde genel konkordans olarak tanımlanmıştır.

2x2 konkordans analizi için skorlar, boyama intensitesinin 0 veya 1+ olması durumunda negatif ve 2+ veya 3+ skorları için pozitif olarak yorumlanmıştır. 3x3 konkordans analizi için skorlar, boyamanın 0 veya 1+ olması durumunda negatif, 2+ skorları için belirsiz ve 3+ skorları için pozitif olarak yorumlanmıştır. Veri pozitif boyama anlaşması ve negatif boyama anlaşması için de analiz edilmiştir.

Sonuçlar - Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor - Mide

2x2 Konkordans Sonuçları

BOND tam otomatik gelişmiş boyama sistemini kullanan tam otomatik Bond Oracle HER2 IHC System ile Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) arasındaki konkordans, 287 numune üzerinde gerçekleştirilmiştir.

İki test arasında 2x2 analizde gözlenen konkordans, %91.95 - 97.31'lik %95 CI ile %95.12 (273/287) olarak bulunmuştur. Bu veri, sözleşmenin bir p değeri < 0.0001 ile % 75'ten daha büyük olmadığı sıfır hipotezinin (H_0) reddedilmesini destekler. Yüzde pozitif anlaşması (hassaslık) veya Bond Oracle HER2 IHC System'in Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitif numuneleri doğru şekilde tespit etme yeteneği (tüm Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitif numunelerde Bond Oracle HER2 IHC System ve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitif skorlu numune yüzdesi) %85.03-94.87'lik %95 CI ile %90.79 (138/152) olarak bulunmuştur. Yüzde negatif anlaşması (özelliklik) veya testin Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif numuneleri doğru şekilde tespit etme yeteneği (tüm Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif numunelerde Bond Oracle HER2 IHC System ve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif skorlu numune yüzdesi) %97.30-100'lük %95 CI ile %100 (135/135) olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 11).

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

Toplam Konkordans (%95 CI) = %95.12 (%91.95-%97.31)

Tablo 11. Mide dokusunda Bond Oracle HER2 IHC System boyama ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor 2x2 Konkordans.

3x3 Konkordans Sonuçları

İki test arasında 3x3 analizde gözlenen konkordans, %85.81-93.13'lük %95 CI ile %89.90 (258/287) olarak bulunmuştur. Bu nedenle, sözleşmenin bir p değeri < 0.0001 ile % 75'ten daha büyük olmadığı sıfır hipotezi (H_0) reddedilmiştir. 3+ yüzde pozitif anlaşması veya Bond Oracle HER2 IHC System'in Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitif numuneleri doğru şekilde tespit etme yeteneği (tüm 3+ Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitif numunelerde Bond Oracle HER2 IHC System ve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) 3+ pozitif skorlu numune yüzdesi) %78.69-91.45'lük %95 CI ile %85.94 (110/128) olarak bulunmuştur. Yüzde negatif anlaşması (özgüllük) veya testin Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif numuneleri doğru şekilde tespit etme yeteneği (tüm Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif numunelerde Bond Oracle HER2 IHC System ve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatif skorlu numune yüzdesi) %97.30-100'lük %95 CI ile %100 (135/135) olarak bulunmuştur. Bakınız Tablo 12.

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

Toplan Konkordans (%95 CI) = %89.90 (%85.81-%93.13)

Tablo 12. Mide dokusunda Bond Oracle HER2 IHC System boyama ile Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor 3x3 Konkordans.

İmmünreaktivite – Normal Paneli

Normal Doku Tipi	Boyama Paterni	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Adrenal	Negatif	Negatif
Beyin, Serebellum	Negatif	Negatif
Beyin, Serebrum	Negatif	Negatif
Meme	Negatif	Negatif
Kemik İliği	Negatif	Negatif
Kolon	Negatif	Negatif
Özofagus	Negatif	Negatif
Göz	Negatif	Negatif
Hipofiz bezi	Hipofizeal hücrelerde gözlemlenen moderat sitoplazmik boyama (1/3)	Negatif
Böbrek	Negatif	Negatif
Larenks	Negatif	Negatif
Karaciğer	Negatif	Negatif
Akciğer	Negatif	Negatif
Mezotelyum	Negatif	Negatif
Over	Negatif	Negatif
Pankreas	Negatif	Negatif
Paratiroid	Negatif	Negatif
Periferik Sinir	Negatif	Negatif
Prostat	Negatif	Negatif
Tükürük Bezi	Negatif	Negatif
Cilt	Negatif	Negatif
İnce Bağırsak	Negatif	Negatif
Dalak	Negatif	Negatif
Mide	Hipofizeal hücrelerde gözlemlenen zayıf sitoplazmik boyama (2/3)	Negatif
Çizgili Kas	Negatif	Negatif
Testis	Negatif	Negatif
Timus	Negatif	Negatif
Tiroid	Negatif	Negatif
Tonsil	Negatif	Negatif
Uterin Serviks	Negatif	Negatif
Uterus	Negatif	Negatif

Tablo 13. Normal Panel Boyama

Tekrarlanabilirlik Çalışması

İçinde ve Arasında Hassasiyet Testi

Hassasiyet testi Leica Biosystems, Newcastle Ltd'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan doku, Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea) tarafından sağlanan ve 20, 4mm çapta invazif meme kanseri dokusu çekirdeklerini içeren formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş kompozit doku mikro dizisidir (TMA). Önceden atanan HER2 skorları baz alınarak 20 vaka seçilmiştir. Bu bazda x5 HER2 3+ vaka, x5 HER2 2+ vaka, x5 HER2 1+ vaka ve x5 HER2 0 vaka dahil edilmiştir.

A. Çalıştırma İçerisinde Hassasiyet Testi

Bond Oracle HER2 IHC System'in çalıştırma içerisinde hassasiyet testi, 20 invazif meme tümöründen ve 40 HER2 Control Slides'dan oluşan bir TMA'dan art arda toplam 40 seksiyonda değerlendirilir. Tüm lamlar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'da Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır. Seksiyonlar, aynı üretici serisinden bir Bond Oracle HER2 IHC System kullanılarak sürekli bir periyot süresince boyanmıştır. Boyanan seksiyonlar, çalıştırma içerisinde hassasiyeti belirlemek amacıyla tek bir deneyimli gözlemci tarafından randomize bir şekilde karıştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Çalıştırma içerisinde tetkikten lamaların değerlendirilmesi, 733/800 (% 91.63) test verisi puanının yorumlanabildiğini göstermiştir. 40 veri puanı, sadece DCIS'nin mevcut olması nedeniyle hariç tutulmuştur ve sonraki 27 veri puanı, bir invazif tümör kaybı nedeniyle yorumlanamamıştır (3 çekirdeğe özel). Boyamada varyasyon, olası 733 boyama olayının 61'inde (% 8.32) gerçekleşmiştir. 37 okazyonda 3+'den 2+'ye (n = 20) ve 1+'den 0'a (n = 17) varyasyon gözlemlenmiştir ve bu nedenle bir 2x2 veri değerlendirmesinde klinik olarak pozitiften klinik olarak negatife bir değişiklik veya tam tersi göstermemiştir. Kalan 24 (% 3.27) okazyon, klinik olarak negatiften (0 veya 1+) klinik olarak pozitif (2+ veya 3+) bir değişiklik göstermiştir. Geçiş değeri = % 96.7 (% 95 CI = % 95.15 - % 97.81).

B. Çalıştırma Arasında Hassasiyet Testi

Bond Oracle HER2 IHC System'in çalıştırma arasında hassasiyet testi, 20 invazif meme tümöründen ve 24 HER2 Control Slides'dan oluşan bir TMA'dan alınan art arda toplam 24 seksiyonda değerlendirilir. Tüm lamlar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'da Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır. Lamalar, aynı üretici serisinden bir Bond Oracle HER2 IHC System kullanılarak üç ayrı okazyonda aynı laboratuvar içerisinde gerçekleştirilmiş 8 bağımsız çalıştırmada değerlendirilmiştir. Boyanan lamalar, çalıştırma arasında hassasiyeti belirlemek amacıyla tek bir deneyimli gözlemci tarafından randomize bir şekilde karıştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Çalıştırma arasında tetkikten lamaların değerlendirilmesi, 456/480 (% 95.00) test verisi puanının yorumlanabildiğini göstermiştir. 24 veri puanı, bir invazif tümör kaybı nedeniyle yorumlanamamıştır (5 çekirdeğe özel). Boyamada varyasyon, olası 456 veri puanının 42'sinde (% 9.21) gerçekleşmiştir. 30 okazyonda 3+'ten 2+'ye (n = 10) ve 1+'den 0'a (n = 20) varyasyon gözlemlenmiştir ve bu nedenle bir 2x2 veri değerlendirmesinde klinik olarak pozitiften klinik olarak negatife bir değişiklik veya tam tersi göstermemiştir. Kalan 12 (% 2.63), klinik olarak negatiften (0 veya 1+) klinik olarak pozitif (2+ veya 3+) bir değişiklik göstermiştir. Geçiş değeri = % 97.37 (% 95 CI = % 95.90 - % 98.77).

C. Lot'a Lot Tekrarlanabilirliği

Lot'a lot tekrarlanabilirliğini belirlemek için Bond Oracle HER2 IHC System'in 3 lotu, 3 ayrı okazyonda GMP altında üretilmiş ve dört farklı formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş doku bloğundan (0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 boyama intensitesini gösteren) ve üç HER2 Control Slides'dan (12 kontrol verisi puanı) alınan 24 meme tümörü seksiyonunda (24 test veri puanı) değerlendirilmiştir. Bağımsız üç çalıştırma, her biri bir Bond Oracle HER2 IHC System'in ayrı bir üretici lotu kullanılarak üç ayrı okazyonda aynı laboratuvar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tüm lamlar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'da Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır. Boyanan lamalar, lot'a lot tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla tek bir eğitimli gözlemci tarafından randomize bir şekilde maskelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Lot'a lot tetkikten lamaların değerlendirilmesi (testler ve kontroller), 36/36 veri puanının yorumlanabildiğini göstermiştir. Bond Oracle HER2 IHC System'in üç farklı üretici lotu arasında 36 veri puanında varyasyonda varyasyon olmamıştır. Bond Oracle HER2 IHC System ile boyama, üretici serilerinin tümünde tutarlıdır.

D. Laboratuvar Arasında Tekrarlanabilirlik

Bond Oracle HER2 IHC System'in laboratuvar arasında tekrarlanabilirlik testi, 20 invazif meme tümöründen ve 24 HER2 Control Slides'dan oluşan bir TMA'dan alınan 192 seksiyonda 3 bölgede, Leica Biosystems Newcastle Ltd (Bölge A) ve iki bağımsız laboratuvarında (Bölge B ve C) değerlendirilir. Boyanan 192 TMA seksiyonundan 96'sı, HER2 Primary Antibody ile ve 96'sı HER2 Negative Control reagent ile boyanmıştır. Tüm lamalar, tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND'da Bond Oracle HER2 IHC System ile boyanmıştır. Lamalar, aynı üretici serisinden bir BOND Oracle 3 HER2 IHC System kullanılarak üç farklı araştırma aşamasındaki bölgelerin her birinde gerçekleştirilmiş 8 bağımsız çalıştırmada değerlendirilmiştir. Boyanan lamalar, laboratuvar arasında tekrarlanabilirliği belirlemek amacıyla Leica Biosystems, Newcastle Ltd'de tek bir deneyimli gözlemci tarafından randomize bir şekilde karıştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Laboratuvar arasında tekrarlanabilirlik tetkikinden lamaların değerlendirilmesi, 1477/1920 (% 76.93) test verisi puanının yorumlanabildiğini göstermiştir. 443 test verisi puanı, aşağıdaki nedenlerden ötürü yorumlanamamıştır:

- 2 çalıştırma/160 test verisi puanının kaldırılmasıyla sonuçlanan 2/24 okazyonda HER2 Control Slide'in uygun olmayan performansı. Bu olay, bir defa Bölge A'da ve bir defa Bölge B'de oluşmuştur (kaldırılan araştırma aşamasındaki bölge başına 80 veri testi puanı).
- İçerisinde toplam 24 lamin manuel olarak Bond Oracle HER2 IHC System boyama ve ardından hematoksilin ile karşı boyandığı Bölge C'deki test planından sapma. Bu, HER2 control slides ve TMA test verisi puanının aşırı karşı boyanması ve 240 veri puanının kaldırılmasıyla ile sonuçlanmıştır.
- 23 test verisi puanının kaldırılmasıyla sonuçlanan invazif tümör kaybı. Bu olay, Bölge A'da 23 okazyonda oluşmuştur ve bu tetkikin tamamlanması için gerekli art arda 192 TMA seksiyonunun üretilmesinde TMA bloğunda doğrudan doku kaybı ile sonuçlanmıştır.
- 20 veri puanının kaldırılmasıyla sonuçlanan tamamen otomatik gelişmiş boyama sistemi BOND ile uygun olmayan yıkama nedeniyle yorumlanamayan boyama.

Laboratuvar arasında hassasiyet tetkiki, boyamada varyasyonun olası 1477 boyama olayından 79'unda (% 5.28) gerçekleştiğini göstermiştir. Bunlardan 14/1477 (% 0.95) okazyonda 0'dan 1+'e veya 2+'den 3+'ya varyasyon gözlemlenmiştir ve aynı şekilde bir 2x2 veri değerlendirmesinde klinik olarak pozitiften klinik olarak negatife bir değişiklik veya tam tersi göstermemiştir. Geçiş değeri = % 99.05 (% 95 CI = % 98.42 - % 99.46). 14 boyama olayından 5/1477 (% 0.34) boyama olayı, Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Bölge A)'da, 8/1477 (% 0.54) boyama olayı Bölge B'de ve 1/1477 (% 0.07) boyama olayı Bölge C'de oluşmuştur.

Kalan 65/1477 (% 4.40) boyama olayı, 2+'dan 1+'e veya 2+'den 0'a varyasyon göstermiştir ve bu nedenle bir 2x2 veri değerlendirmesinde klinik olarak pozitiften klinik olarak negatife bir değişiklik veya tam tersi göstermiştir. Geçiş değeri = % 95.6 (% 95 CI = % 94.42 - % 96.54). Klinik olarak belirgin 65 değişiklikten 11/65 (% 16.9) değişiklik Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Bölge A)'da, 24/65 (% 36.9) değişiklik Bölge B'de ve 30/65 (% 46.1) değişiklik Bölge C'de oluşmuştur. Klinik olarak belirgin değişikliklerden hiçbir okazyonda bir 3+ değişikliği bir negatif (0 veya 1+) sonuç veya tam tersi ortaya çıkarmamıştır.

E. Gözlemciler Arasında Tekrarlanabilirlik

HER2 IHC derecelerinden (rezeksiyon numuneleri) her birine eşit dağılım sağlayan rastgele seçilen 40 invazif meme kanseri vakası, art arda seksiyonlandır ve boyama ve yorumlama için Leica Biosystems, Newcastle Ltd (Bölge A), Bölge B ve Bölge C'ye sağlanır. Seksiyonlar, skora öncesinde her bölgede karıştırılmış ve randomize edilmiştir. İki bağımsız klinik bölgesi, Bölge B ve Bölge C, arasındaki gözlemciler arasında sözleşme % 87.5 (% 95 CI = % 73.3 - % 95.8) idi. Bölge B ve Bölge C ve Leica Biosystems Newcastle, Ltd arasındaki sözleşme art arda % 92.5 (% 95 CI = % 79.6 - % 98.4) ve % 85 (% 95 CI = % 70.1 - % 94.29) idi. Üç gözlemci (A, B, C) arasındaki toplam eş zamanlılık analizi % 82.50'dir.

F. Enstrüman Arasında Hassasiyet (BOND-MAX - BOND-III)

Bond Oracle HER2 IHC System'i kullanan enstrüman arasında hassasiyet testi, bağımsız bir araştırma aşamasındaki Avrupa bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Test edilen örnekler formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş tümü yüz otuz sekiz (138) invazif meme kanseri vakalarından (iğne çekirdek ve rezeksiyon numuneleri) olan seksiyonlardan elde edilmiştir. Enstrümanlar arasında test, muhtemel şekilde araştırma aşamasındaki bölge içerisinde BOND-MAX ve BOND-III platformlarında art arda seksiyonlar boyanarak gerçekleştirilmiştir. Üç vaka, çalışmadan kaldırılan örnek/tümör nedeniyle uygunsuz olarak ele alınmıştır.

Her enstrümanda Bond Oracle HER2 IHC System ve yardımcı BOND enstrümanı için aynı lot numaraları kullanılmıştır. Bölümler geriye dönük olarak boyandı. Lamlar, enstrüman arasında hassasiyeti belirlemek amacıyla tek bir deneyimli gözlemci tarafından randomize araştırma aşamasındaki bölgede yorumlanmıştır.

Enstrüman arasında hassasiyetten lamların değerlendirmesi, % 88.9 - 97.5'lük bir % 95 CI ile % 94.2'lik (130/138) pozitif (2+, 3+) ve negatif (0, 1+) arasında bir 2x2 konkordans ve % 80.2 - 92.1'lik bir % 95 CI ile % 87.0'lik (120/138) pozitif (3+), belirsiz (2+) ve negatif (0, 1+) konkordans arasında bir 3x3 konkordans göstermiştir.

		BOND-MAX		
		Negatif (0/1+)	Pozitif (2/3+)	Toplam
BOND-III	Negatif (0/1+)	80	1	81
	Pozitif (2/3+)	7	50	57
	Toplam	87	51	138

Toplam Konkordans (% 95 CI) = % 94.2 (% 88.9 - 97.5)

Tablo 14. BOND-MAX v BOND-III platformlarında Bond Oracle HER2 IHC System boyama 2x2 konkordansı.

		BOND-MAX			
		Negatif (0/1+)	Belirsiz (2+)	Pozitif (3+)	Toplam
BOND-III	Negatif (0/1+)	80	1	0	81
	Belirsiz (2+)	6	5	1	12
	Pozitif (3+)	1	9	35	45
	Toplam	87	15	36	138

Toplam Konkordans (% 95 CI) = % 87.0 (% 80.2 - 92.1)

Tablo 15. BOND-MAX v BOND-III platformlarında Bond Oracle HER2 IHC System boyama 3x3 konkordansı.

Sonuç olarak bu çalışmada oluşturulan veri, Bond Oracle HER2 IHC System kullanılarak değerlendirildiğinde Leica Biosystems' BOND-MAX ile BOND-III Systems arasında yüksek seviyede bir konkordans olduğunu göstermektedir.

Arıza Giderme

Sorun	Olası Neden	Düzeltilici İşlem
İmmünohistokimyasal boyama yok	Tamamlanmadan çalıştırmanın durdurulması	BOND yazılımını kullanarak boyama çalıştırması sırasında raporlanabilir herhangi bir hata olup olmadığını kontrol edin ve BOND yazılımı tarafından belirtildiği gibi bildirin.
	Hatalı protokol seçimi	Add slide iletişim kutusunun boyama protokolü alanında *IHC Protocol H 'de uygun varsayılan seçimin olduğundan emin olun.
	Lamların uygun olmayan deparafinizasyonu	Add slide iletişim kutusunun hazırlık alanında *Dewax modunun seçili olduğundan emin olun.
	Dağıtılan uygun olmayan bulk reagent'leri	Tüm BOND reagent'lerinin, uygun bulk konteynerlerine dağıtılmış olduğundan ve enstrümanda uygun pozisyonlara yerleştirilmiş olduğundan emin olun.
	Sodyum azidli BOND Wash Solution kontaminasyonu	Uygun çalışma şiddeti için hazırlanmış yeni BOND Wash Solution kullanın.
Zayıf spesifik immünohistokimyasal boyama	Uygun olmayan epitop retrieval	Uygun BOND Epitope Retrieval reagent'lerinin doğru bulk konteynerlerine dağıtıldığından ve BOND yazılımının uygun epitop retrieval protokolüne, *HIER 25 min with *ER1 (97), ayarlanmış olduğundan emin olun.
	Test numunesinin uygun olmayan fiksasyonu ve işlemi	Formalinle fikse etme tipinin kullanıldığından ve işleme programlarının test edilen numune için uygun olduğundan emin olun.
	Bond Oracle HER2 IHC System'in son kullanma tarihi geçmiştir	Kullanılan Bond Oracle HER2 IHC System'in, belirtilen son kullanma tarihleri arasında olduğundan emin olun.
Aşırı spesifik immünohistokimyasal boyama	Uygun olmayan epitop retrieval	Uygun BOND Epitope Retrieval reagent'lerinin doğru bulk konteynerlerine dağıtıldığından ve BOND yazılımının *HIER 25 min with *ER1 (97) protokolüne ayarlanmış olduğundan emin olun.
	Fikse etmede varyasyon	Formalinle fikse etme tipinin kullanıldığından ve işleme programlarının test edilen numune için uygun olduğundan emin olun. Mümkünse başka bir blok kullanarak vakayı tekrar test edin. Bu mümkün değilse boyanan ilgili H&E seksiyonuna göre en iyi fikse etme paternlerini gösteren alanları değerlendirin.

Sorun	Olası Neden	Düzeltilici İşlem
Nonspesifik arka plan boyama	Dağıtılan uygun olmayan bulk reagent'leri	Tüm BOND reagent'lerinin, uygun bulk konteynerlerine dağıtılmış olduğundan ve enstrümanda uygun pozisyonlara yerleştirilmiş olduğundan emin olun.
	Lamların uygun olmayan deparafinizasyonu	Add slide iletişim kutusunun hazırlık alanında *Dewax modunun seçili olduğundan emin olun.
	Dokuda nonspesifik immünohistokimyasal çapraz reaksiyon	Normal doku çapraz reaksiyonunun BOND Oracle HER2 BOND IHC System açıklamasına bakınız (bakınız Tablo 13).
	Nekroz doku alanları ile nonspesifik immünohistokimyasal çapraz reaksiyon	Formalinle fikse etme tipinin kullanıldığından ve işleme programlarının test edilen numune için uygun olduğundan emin olun. Mümkünse başka bir blok kullanarak vakayı tekrar test edin. Bu mümkün değilse boyanan ilgili H&E seksiyonuna göre en iyi fikse etme paternlerini gösteren alanları değerlendirin.
	Bir boyama çalıştırmasının tamamlanmasının ardından kurulama artefaktı	Lamlar, bir gece çalıştırmasına yerleştirilecekse BOND gecikmeli başlatma fonksiyonunun kullanılması önerilir. Lamların kurumasını önlemek amacıyla bu periyotta lamlara dağıtılacak uygun miktarda distile veya deiyonize su olduğundan emin olun.
	Kolalı katkı maddesi yardımıyla lamlara yapışan seksiyonlar	Kolasız lamlar kullanın (Leica BOND Plus Slides – ürün kodu S21.2113 veya Apex BOND Slides - ürün kodu 3800040).
Hasta/kontrol lam(lar) ından kopan doku	Hatalı tipte lam kullanılması veya uygun olmayan seksiyon boşaltması	Hasta/kontrol seksiyonları için uygun lamların kullanıldığından emin olun (Leica BOND Plus Slides – ürün kodu S21.2113 veya Apex BOND Slides - ürün kodu 3800040). Lamlarda uygun boşaltma yapıldığından ve lamların 12–18 saat boyunca 37 °C'de (gece) inkübe edildiğinden emin olun. Daha fazla adherans gerektiren seksiyonlar, bir saat daha 60 °C'de inkübe edilebilir.

Tablo 16. Bond Oracle HER2 IHC System Arıza Giderme Kılavuzu.

Bond Oracle HER2 IHC System ile ilgili herhangi bir sorunun, arıza giderme kılavuzunun (bakınız Tablo 16) kapsamı dışında kalması halinde destek için yerel Leica Biosystems Teknik Servis Departmanı'nız veya Distribütör ile irtibata geçin.

Referanslar

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. *PathologyInternational* 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. Tommola, 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 IIa 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: 836-43.
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.










Önceki baskıya göre değişiklikler

Sağlanan Komponentler, Sembol Tanıma.

Yayın tarihi

16 Temmuz 2020

Sembol Tanıma

	Seri Kodu		Saklama		Katalog numarası
	In vitro diagnostik medikal cihaz		Üretici		Hassas
	eIFU - kullanım talimatlarına başvuru		<n> test için yeterli içerik		YYYY-AA-GG tarihinde kullanım
SN	Seri Numarası	Rx Only	Sadece reçete		

HercepTest™ DakoCytomation, Denmark A/S'nin bir ticari markasıdır ve lisansına tabidir Herceptin® Genentech, Inc. ve F. Hoffmann-La Roche Ltd'nin bir ticari markasıdır.