

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Инструкции за употреба

За употреба с Leica Biosystems' BOND™ напълно автоматизирана, усъвършенствана система за оцветяване.

Product Code TA9145 е предназначен да оцветява 60 теста (150 предметни стъкла):

60 тестови предметни стъкла с HER2 Primary Antibody

60 тестови предметни стъкла с HER2 Negative Control

15 HER2 Control Slides с HER2 Primary Antibody

15 положителни амбулаторни контроли на тъкан с HER2 Primary Antibody



Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
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

Съдържание

Употреба	3
Резюме и обяснение	3
Основа	3
Експресия на HER2	3
Резюме за клинично съгласуване	3
Принцип на процедурата	4
Предоставени компоненти.....	4
Насоки за употреба.....	5
Съхранение и стабилност.....	5
Подготвяне на проба	5
Предупреждения и предпазни мерки	6
Процедура	7
A. Необходими реагенти, които не са доставени	7
B. Необходимо оборудване, което не е доставено	7
C. Методология	7
D. Оформление на предметното стъкло.....	7
E. Процедурни стъпки	8
Качествен контрол	10
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	12
Амбулаторна Positive Control на тъкан – HER2 Primary Antibody.....	12
Компонент за амбулаторна Negative Control на тъкан – HER2 Primary Antibody.....	12
Пациентска тъкан – HER2 Negative Control	12
Пациентска тъкан – HER2 Primary Antibody	13
Проверка на образаца	13
Тълкуване на оцветяването	13
Логическа обосновка на поръчката за скрийнинг на предметни стъкла	14
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	14
2. Амбулаторна положителна контрола на тъкан – HER2 Primary Antibody.....	14
3. Компонент за амбулаторна Negative Control на тъкан – HER2 Positive Control.....	14
4. Пациентска тъкан – оцветена с помощта на HER2 Negative Control.....	14
5. Пациентска тъкан – оцветена с помощта на HER2 Primary Antibody	14
Ограничения	15
A. Общи ограничения	15
B. Специфични за продукта ограничения	15
Данни за клетъчна линия	16
Клинично съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System с Dako HercepTest	16
Резултати от 2x2 съгласуване	17
Резултати от 3x3 съгласуване	18
Клинично съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System с PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	18
Резултати от 3x2 съгласуване	19
Имунореактивност – Нормален набор	20
Изследване на възпроизводимостта	21
Тестване с точност на резултатите в една и в няколко серии.....	21
A. Тестване с точност на резултатите в една серия	21
B. Тестване с точност на резултатите в няколко серии	21
C. Възпроизводимост от серия в серия	22
D. Междулабораторна възпроизводимост.....	22
E. Възпроизводимост между наблюдателите	23
F. Точност между инструментите (BOND-MAX c/y BOND-III).....	23
Разрешаване на проблеми	25
Референции	27

Употреба

За използване при диагностика ин витро

Bond Oracle HER2 IHC System е полуколичествен имунохистохимичен (IHC) образец за определяне на статуса на онкопротеина HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) в тъкан с рак на гърдата, обработвана за хистологично оценяване. Bond Oracle HER2 IHC System се посочва като помощно средство при определянето на пациенти, за които трябва да се разгледа възможността от лечение с Herceptin® (trastuzumab) (вж. листовката в опаковката на Herceptin®).

Бележка: Всички пациенти в клиничните опити с Herceptin® са подбрани с помощта на изследващ имуноцитохимичен набор от клинични изпитвания (CTA). Нито един от пациентите в тези изпитвания не е бил избран с помощта на Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System е сравнена с Dako HercepTest™ на базата на независим набор от проби и е сметнато, че предоставя приемливи резултати за съгласуване, както това е посочено в резюмето за клинично съгласуване. Актуалното съотнасяне на Bond Oracle HER2 IHC System към клиничния резултат не е установено.

Резюме и обяснение

Основа

Bond Oracle HER2 IHC System съдържа мише моноклонално анти-HER2 антитяло, клонинг CB11. Клонингът CB11, който е първоначално разработен от Corbett et al (1) и произведен от Novocastra Laboratories Ltd (сера Leica Biosystems Newcastle Ltd), е насочен срещу вътрешния домейн на онкопротеина HER2.

В част от пациенти с рак на гърдата онкопротеинът HER2 е свръхекспресиран като част от процеса на злокачествена трансформация и прогрес на тумора (2). Свръхекспресията на онкопротеина HER2, която е налице в клетките с рак на гърдата, води до предположението, че HER2 може да е цел за терапия на базата на антитяло. Herceptin® е хуманизирано моноклонално антитяло (3), което се свързва с голям афинитет към онкопротеина HER2 и е доказано, че потиска пролиферацията на човешки туморни клетки, които свръхекспресират онкопротеина HER2 както ин витро, така и ин vivo (4–6).

От първия метод за имунопероксидаза, докладван от Nakane and Pierce (7), много разработки са се появили в областта на имунохистохимията, което е довело до увеличена чувствителност. Една от последните разработки е използването на полимерно обозначаване. Тази технология се прилага както към първите антитела, така и към системите за имунохистохимично откриване (8). Системата за откриване Compart Polymer™, използвана от Bond Oracle HER2 IHC System, е част от семейство нови технологии за контролирана полимеризация, които са специфично разработени за подготвяне на полимерни HRP-свързани конюгати на антитела. Тъй като тази полимерна технология се използва в продуктивния диапазон на Oracle, не се появява проблемът с неспецифичното ендогенно биотиново оцветяване, което може да се наблюдава при системите за откриване на стрептавидин/биотин.

Експресия на HER2

Онкопротеинът HER2 се експресира при нива, откриваеми от имунохистохимията в до 20% от аденокарциномите от различни места. Между 10% и 20% от инвазивните дуктални карциноми на гърдата са положителни за онкопротеин HER2 (9). 90% от случаите на дуктални карциноми in situ (DCIS) от тип комедо са положителни (10) заедно с почти всички случаи на болестта на Пейджет на гърдата (11).

Резюме за клинично съгласуване

Bond Oracle HER2 IHC System беше разработена, за да предостави алтернатива на изследващия набор от клинични изпитвания (CTA), който е използван при клиничните

изследвания с Herceptin®. Представянето на Bond Oracle HER2 IHC System за определяне на свръхекспресираността на онкопротеина HER2 бе оценено в независимо изследване, сравняващо резултатите на Bond Oracle HER2 IHC System с тези на Dako HercepTest при 431 проби от тумор на гърдата с произход от САЩ. Нито една от тези проби от тумори не са получени от пациенти в клинични изследвания на Herceptin®. Резултатите показваха 92,34% съгласуване в 2x2 анализ (95% интервали на доверие от 89,42% до 94,67%) и 86,54% в 3x3 анализ (95% интервали на доверие от 82,95% до 89,62%) между резултатите от двата образца.

Принцип на процедурата

Bond Oracle HER2 IHC System съдържа компоненти, необходими за извършване на процедура по имунохистохимично оцветяване за фиксирани във формалин и включени в парафин тъкани. След инкубация с готово за използване HER2 Primary Antibody (клонинг CB11) тази система използва готова за използване технология Compact Polymer (компактен Polymer). Ензимната конверсия на последващо добавения хромоген води до формиране на видим продукт на реакцията в антигенното място. Секциите на тъканта могат след това да бъдат контраоцветени, дехидратирани, изчистени и закрепени. Резултатите се тълкуват с помощта на светлинна микроскопия. Контролни предметни стъкла с четири фиксирани във формалин и включени в парафин линии с човешки клетки с рак на гърдата са осигурени за валидиране на сериите на оцветявания. Четирите клетъчни линии демонстрират експресия на онкопротеина HER2 при интензивности от 0, 1+, 2+ и 3+. Интензивността на оцветяване на тези клетъчни линии съответства както на рецепторното натоварване на онкопротеина HER2 на клетка, така и на статуса на гена амплификация на HER2.

Bond Oracle HER2 IHC System (продуктов код TA9145) трябва да се използва с Leica Biosystems' BOND напълно автоматизирана усъвършенствана система за оцветяване.

Предоставени компоненти

Материалите, посочени по-долу (таблица 1), са достатъчни за оцветяване на 150 предметни стъкла (60 тестови предметни стъкла, инкубирани с HER2 Primary Antibody, 60 съответстващи тестови предметни стъкла, инкубирани с HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides, инкубирани с HER2 Primary Antibody и 15 амбулаторни положителни контроли на тъкан с HER2 Primary Antibody). Броят на тестовете се базира на използването на 150 µL автоматизирано разпределяне на предметно стъкло. Комплектът осигурява материали, които са достатъчни за максимум 15 отделни BOND серии на оцветяване.

HER2 Control Slides, (x15)	Секции от фиксирани във формалин и включени в парафин линии с човешки клетки с рак на гърдата, които демонстрират експресия на онкопротеина HER2 при 0, 1+, 2+ и 3+ интензивности на оцветяване в съответствие с предоставения протокол. Тези секции са напълно слепени и не изискват допълнителна топлинна обработка.
HER2 Primary Antibody, 13,5 mL	Съдържа готово за използване афинитетно пречистено мише моноклонално IgG анти тяло, клонинг CB11 и 0,35% ProClin™ 950.
HER2 Negative Control, 9 mL	Съдържа готов за използване миши IgG в еквивалентна концентрация на HER2 Primary Antibody и 0,35% ProClin™ 950.
Peroxide Block, 22,5 mL	Съдържа 3-4% азотен пероксид.
Post Primary, 22,5 mL	Заешки анти-миши IgG (<10 µg/mL) в трис-буферен физиологичен разтвор, съдържащ 10% (v/v) животински серум и 0,09% ProClin™ 950.
Polymer, 22,5 mL	Поли-HRP кози анти-заешки IgG (<25 µg/mL) в трис-буферен физиологичен разтвор, съдържащ 10% (v/v) животински серум и 0,09% ProClin™ 950.
DAB Part 1, 2,25 mL	Съдържа 66 mM 3,3'-диаминобензидин тетрахидрохлорид в разтвор на стабилизатор.
DAB Part B (x2), 22,5 mL	Съдържа ≤0,1% (v/v) азотен пероксид.
Hematoxylin, 22,5 mL	Съдържа <0,1% Hematoxylin.

Таблица 1. Компоненти на Bond Oracle HER2 IHC System

Насоки за употреба

Всички доставени реагенти са формулирани специфично за използване с този образец и партидните номера са специфични за всяка Bond Oracle HER2 IHC System. За да е валиден образеца, не трябва да се правят замествания.

Съхранение и стабилност

Да се съхранява при 2–8 °C. Да не се замразява. Да се върне до температура от 2–8 °C непосредствено след употреба. Всяко отклонение от тези условия ще направи образеца невалиден. Уверете се, че използваната Bond Oracle HER2 IHC System е в срок на годност. Признаците, указващи замърсяване и/или нестабилност на Bond Oracle HER2 IHC System са: мътност на разтворите, образуване на миризма и наличието на утайка. Условия на съхранение, различни от тези, които са посочени по-горе, трябва да са потвърдени от потребителя.

Подготвяне на проба

Всички проби трябва да са подготвени така, че да съхраняват тъканта за имунохистохимично оцветяване. Стандартните методи за обработка на тъкани трябва да се използват за всички проби (12).

Препоръчва се тъканите да се подготвят във фиксатори на формалинова основа и да са рутинно обработени и включени в парафин. Например пробите от ресекция трябва да се

блокират на дебелина от 3–4 мм и да се фиксират за 18–24 часа в 10% неутрално буферен формалин. Тъканите трябва след това да се дехидратират в серия от алкохоли и да се изчистят чрез ксилен, след което да се импрегнират с разтопен парафинов восък, който да е с температура от не повече от 60 °С. Пробите от тъкани трябва да са на разстояние между 3–5 µm.

Предметните стъкла, необходими за оценка на онкопротеина HER2 и за проверка за тумор, трябва да са подготвени по едно и също време. За запазване на антигенността секциите от тъкани, закрепени върху предметните стъкла (Leica BOND Plus Slides – продуктово код S21.2113) трябва да се оцветят в рамките на 4–6 седмици от разделянето, ако се държат при стайна температура (18–24 °С). След разделянето се препоръчва предметните стъкла да се инкубират за 12–18 часа (през нощта) при 37 °С. Секциите, които изискват допълнително слепване, могат да се инкубират при 60 °С за още един час. В САЩ Законът за клинично лабораторно подобрене от 1988 г. гласи в 42 CFR 493.1259(b), че “Лабораторията трябва да запазва оцветените предметни стъкла за поне десет години от датата на изпитването и да запазва блокове с проби най-малко две години от датата на изпитването”.

Предупреждения и предпазни мерки

Само за професионални потребители.

Един или няколко компонента в продукта са опасни.

По правило на лица под 18-годишна възраст не е позволено да работят с този продукт. Потребителите трябва внимателно да са инструктирани за правилната процедура на работа, опасните свойства на продукта и необходимите инструкции за безопасност.

Симптомите на преекспозиция на ProClin™ 950, използваният в реагентите на Oracle консервант, могат да включват дразнене на очите и кожата и дразнене на лигавиците и горните дихателни пътища. Концентрацията на ProClin™ 950 в настоящия продукт е до максимум 0,35%. Тези разтвори не отговарят на критериите на OSHA за опасно вещество. Лист с данни за безопасност за материала е на разположение при поискване или на адрес www.LeicaBiosystems.com.

Пробите преди и след фиксиране, както и всички материали, които са изложени на тях, трябва да се третират така, че да не се предават инфекции, както и да се изхвърлят при спазване на подходящите предпазни мерки.

Никога не капете реагенти в устата и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти и проби. Ако реагенти или проби влезнат в контакт с чувствителни области, измийте с обилно количество вода. Потърсете лекарска помощ. Консултирайте се с федералните, щатските или локални разпоредби за изхвърляне на потенциално токсични компоненти.

Намалете микробното замърсяване на реагентите, в противен случай може да се получи увеличаване на неспецифичното оцветяване.

Процедура

A. Необходими реагенти, които не са доставени

- BOND Dewax Solution (продуктов код AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (продуктов код AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (продуктов код AR9590)
- Стандартни разтворители, използвани в имунохистохимията (напр. етанол, абсолютен и степенуван)
- Ксилен (или ксиленови заместители)
- Закрепващо средство
- Дистилирана или дейонизирана вода

B. Необходимо оборудване, което не е доставено

- Leica Biosystems' BOND-MAX и BOND-III напълно автоматизирана усъвършенствана система(и) за оцветяване
- BOND Universal Covertiles™ (продуктов код S21.2001, S21.4583 или S21.4611)
- BOND Mixing Stations (продуктов код S21.1971)
- Изсушаваща пещ, способна да поддържа 60 °C
- Светлинен микроскоп (4–40x увеличение на обектива)
- Предметни стъкла (Leica BOND Plus Slides – продуктов код S21.2113)
- Покривни стъкла
- BOND Slide Label & Print Ribbon (продуктов код S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (продуктов код CS9100)

C. Методология

- Преди да предприемат тази методология, потребителите трябва да бъдат обучени за напълно автоматичните имунохистохимични методи на BOND.
- Всяка тестова секция, която трябва да се оцветява с HER2 Primary Antibody, ще изисква идентична секция за оцветяване с HER2 Negative Control. Секцията с негативен контрол позволява разграничаване между специфично и неспецифично оцветяване в антигенното място. Всяка BOND серия на оцветяване трябва да включва HER2 Control Slide. В края на протокола по оцветяване, ако клетъчните линии не демонстрират правилни модели на оцветяване (обърнете се към Bond Oracle HER2 IHC Systems Interpretation Guide), серията трябва да се счита за невалидна.

D. Оформление на предметното стъкло

Нов BOND Universal Covertile (продуктов код S21.2001, S21.4583 или S21.4611) трябва да се използва за всяко предметно стъкло. Използването на BOND Universal Covertiles, който преди това е използван за имунохистохимично или *in situ* хибридационно оцветяване, не е валидирано за този тест.

Оформление на табличката за предметни стъкла (таблица 2) помага за оптимално представяне на Bond Oracle HER2 IHC System и получаване на пълния брой от 60 теста.

Позиция на предметното стъкло	Описание на предметното стъкло	Реагент	Тип тъкан	Икона на предметното стъкло
1	Капсула 1	*HER2 Negative Control	Тест	
2	Капсула 2	*HER2 Negative Control	Тест	
3	Капсула 3	*HER2 Negative Control	Тест	
4	Капсула 4	*HER2 Negative Control	Тест	
5	Капсула 1	*HER2 Primary Antibody	Тест	
6	Капсула 2	*HER2 Primary Antibody	Тест	
7	Капсула 3	*HER2 Primary Antibody	Тест	
8	Капсула 4	*HER2 Primary Antibody	Тест	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Положително	
10	Амбулаторна контрола на тъкан	*HER2 Primary Antibody	Положително	

Таблица 2. Оформление на табличката за предметни стъкла показващо типа тъкан и реагента

Е. Процедурни стъпки

Следвайте стъпките по-долу за задаване на табличка за предметни стъкла с оформлението, описано в таблица 2. Тези инструкции трябва да са в съответствие с наръчника на потребителя на BOND System.

1. Върху BOND инструмента се уверете, че контейнерите за насипни и опасни отпадъци имат достатъчен капацитет за извършване на необходимите серии на оцветяване.
2. Уверете се, че има адекватно количество алкохол, дистилирана или дейонизирана вода, BOND Dewax Solution (доставя се готов за употреба), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (доставя се готов за употреба) и BOND Wash Solution (доставя се като x10 Concentrate) в контейнерите за насипен реагент, за да се извършват необходимите серии на оцветяване.
3. Уверете се, че е монтирана чиста BOND Mixing Station.
4. Включете напълно автоматичната усъвършенствана система за оцветяване на BOND.
5. Включете BOND регулатор, прикрепен към BOND напълно автоматизиран, напреднали оцветяване система.

6. Отворете софтуера на BOND.
7. За нова Bond Oracle HER2 IHC System сканирайте баркодовете на табличката на реагента с ръчен скенер, за да въведете системата в реагентния инвентар на BOND.
8. Отидете на екрана за настройка на предметните стъкла и щракнете **Add case**.
9. Въведете детайли за първата капсула. Уверете се, че обемът е зададен на **150 µL** и протоколът за препарата е ***Dewax** на парафин. Щракнете върху ОК.
10. С маркираната капсула на екрана за настройка на предметните стъкла щракнете **Add slide**.
11. Първо добавете пациентски тестови предметни стъкла. Уверете се, че типът тъкан е зададен на **Test tissue**.
12. Потвърдете обема като 150 µL и протокола за препарата като ***Dewax**.
13. Изберете стойностите на режим на оцветяване **Single** и **Oracle** (не щракайте върху **Oracle control**).
14. Изберете процес **IHC**.
15. Изберете ***HER2 Negative Control** от списъка с маркери. Раздел "Протоколи" по подразбиране се задава на правилния протокол за оцветяване (***IHC Protocol H**) и HIER протокол (***HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Щракнете върху **Add Slide**. Предметното стъкло с реагент за Negative Control е създадено.
17. Докато все още сте в диалоговия прозорец "Добави предметно стъкло", изберете ***HER2 Primary Antibody** първо от списъка с маркери. Подразбиращите се протоколи и всички други настройки остават непроменени.
18. Щракнете върху **Add slide**. Тестовото предметно стъкло е създадено.
19. Повторете стъпки 8 до 18 докато всички капсули и пациентски тестови предметни стъкла не бъдат създадени.
20. След това създайте HER2 Control Slide. Добавете го към последната капсула или създайте нова капсула за контролни предметни стъкла в зависимост от вашите стандартни лабораторни практики.

Важна бележка: Изискване на Bond Oracle HER2 IHC System е HER2 Control Slide да е включено във всяка серия (т.е. табличка за предметни стъкла), за да се валидира образеца.
21. В диалоговия прозорец "Добави предметно стъкло" задайте типа на тъкан да **Positive Tissue**.
22. Щракнете върху **Oracle Control**.
23. Изберете номера на партидата на HER2 Control Slide стъкло в списъка **Lot No**.
Номерът на партидата е написан в зоната на етикета на предметното стъкло.

Важна бележка: HER2 Control Slide стъкло трябва да е от същата Bond Oracle HER2 IHC System, която ще се използва.
24. Изберете ***HER2 Primary Antibody** първо от списъка с маркери. Запомнете настройките

- за обема, режима на оцветяване, процеса и протокола.
25. Щракнете върху **Add Slide** за добавяне HER2 Control Slide.
 26. Накрая добавете предметно стъкло с положителна амбулаторна контрола на тъкан.
 27. Отменете избора на **Oracle control**.
 28. Изберете ***HER2 Primary Antibody** от списъка с маркери. Запомнете настройките за обема, режима на оцветяване, процеса и протокола. Типът тъкан остава **Positive tissue**.
 29. Щракнете върху **Add slide**. С това завършва създаването на предметно стъкло.
 30. Разпечатайте етикетите за предметните стъкла. Всички етикети за Oracle предметни стъкла имат на себе си отпечатано "OC". Етикетът за HER2 Control Slide също така включва партиден номер на Bond Oracle HER2 IHC System.
 31. Обозначете предметните стъкла по подходящ начин.
 32. Отворете капачиците на всички контейнери от Bond Oracle HER2 IHC System и заредете табличката за реагент в BOND.
 33. Поставете предметните стъкла в табличката за предметни стъкла по реда, указан в част D, таблица 2. Поставете нови Covertiles.
 34. Заредете табличката за предметни стъкла в BOND и натиснете бутона **Load/Unload**.
 35. Потвърдете, че предметните стъкла са сканирани и щракнете върху бутона **Run (Play)** върху екрана за статус на системата.
 36. Уверете се, че индикаторното поле на табличката показва **Proc (OK)** и че груповият номер и времето на завършване са показани.
 37. Когато серията завърши, натиснете бутона **Load/Unload** и извадете табличките с предметни стъкла от BOND.
 38. Махнете Covertiles и изплакнете предметните стъкла с дейонизирана вода.
 39. Дехидратируйте, изчистете и закрепете секциите.

Качествен контрол

Различията във фиксирането на тъканта, обработката и поставянето в потребителската лаборатория могат да доведат до значителна вариация в резултатите, което налага редовно извършване на амбулаторни контроли в допълнение към HER2 контролните предметни стъкла, доставени от Leica Biosystems в Bond Oracle HER2 IHC System. Консултирайте се с насоките за контрол на качеството на Програмата за сертифициране по имунохистохимия на Колежа на американските патолози (CAP); вж. също CLSI (предишно NCCLS) гарантиране на качеството за имуноцитохимия, одобрена насока (12) и Специален доклад: Контрол на качеството в имунохистохимията (13). В допълнение се обърнете към таблица 3 по-долу за типовете имунохистохимични контроли на качеството и за целите, които те имат.

Мостра*	Описание	HER2 Primary Antibody оцветяване	HER2 Negative Control оцветяване
HER2 Control Slide	Както е доставено в Bond Oracle HER2 IHC System.	Контролира процедурата по оцветяване и указва валидността на представянето на реагента.	
Амбулаторна положителна контролна тъкан	Тъкан, съдържаща целеви антиген. Идеалната контрола е слабо позитивна тъкан за оцветяване, така че да се определят леките промени в чувствителността на първото анти тяло.	Контролира всички стъпки от анализа. Валидира подготовката на тъканта и представянето при оцветяване на Bond Oracle HER2 IHC System.	Откриване на неспецифично фоново оцветяване
Компонент на амбулаторна отрицателна контролна тъкан	Тъканите или клетките, които се очаква да са отрицателни (могат да са разположение в пациентската тъкан или в компоненти на положителна/ отрицателна контролна тъкан).	Откриване на неспецифична кръстосана реактивност на анти тялото с клетки/ клетъчни компоненти.	

*Фиксирана и обработена според пациента мостра

Таблица 3. Имунохистохимични контроли на качеството и цели, които те имат

Контролите на тъкан трябва да имат биопсийни или хирургични проби, които да са фиксирани във формалин, обработени и включени в парафин колкото се може по-бързо и то по същия начин, както и пациентската мостра(и). Пробите трябва да са подготвени по подходящ начин, така че да съхраняват тъканната антигенност за имунохистохимично оцветяване. Стандартните методи за обработка на тъкани трябва да се прилагат за всички проби (12).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Всяко от доставените HER2 Control Slides съдържа четири фиксирани във формалин включени в парафин ядра на клетъчни линии с човешки рак на гърдата с оценки на интензивност на оцветяване от 0, 1+, 2+ и 3+. Едно предметно стъкло трябва да бъде включено във всяка тестова серия (т.е. табличка за предметни стъкла). Правилната оценка на HER2 контролното предметно стъкло, доставено от Leica Biosystems, указва валидността на теста (обърнете се към Bond Oracle HER2 IHC System наръчника за тълкуване). HER2 контролните предметни стъкла, доставени с тази система, валидират само представянето на реагента и не потвърждават подготовката на тъканта.

Амбулаторна положителна контрола на тъкан – HER2 Primary Antibody

Ако се използват компоненти за амбулаторни положителни контроли на тъкан, те трябва да имат фиксирани, обработени и поставени биопсийни или хирургични проби колкото се може по-бързо и по същия начин, както и пациентската мостра(и). Положителните контроли на тъкан са индикативни за правилно подготвени тъкани и валидни методи на оцветяване. Най-малко един компонент на положителна контрола за всяка тестова серия трябва да се включи. Положителната контрола секция трябва да демонстрира слабо положително оцветяване, така че да се определят леките промени в чувствителността на първото анти тяло.

Бележка: Известни компоненти на тъканите за положителна контрола трябва да се използват само за наблюдение на правилното представяне на обработваните тъкани заедно с тестовите реагенти, а НЕ като помощно средство при формулирането на специфичното тълкуване на пациентските мостри. Ако тъканта за положителна контрола не успее да покаже подходящо положително оцветяване, получените с пациентските проби резултати трябва да се разглеждат като невалидни.

Контролен блок с множество тъкани, съдържащи тумори, представляващи всички 4 HER2 класа, може също да се използва като подходящ амбулаторен контролен материал.

Компонент за амбулаторна Negative Control на тъкан – HER2 Primary Antibody

Ако се използват компоненти за амбулаторни отрицателни контроли, те трябва да имат пресни биопсийни или хирургически проби, фиксирани, обработени и поставени колкото се може по-бързо и по същия начин, както и пациентската мостра(и). Използването на контролна тъкан, известна като отрицателна за онкопротеин HER2, при всяка серия на оцветяване потвърждава специфичността на първото анти тяло и предоставя индикация за неспецифично фоново оцветяване. Многообразието от различни типове клетки, налични в повечето тъканни секции, предлага вътрешни места за Negative Control (това трябва да се потвърди от потребителя). Нормалните гърдни тръби, които не са свързани с тумор, могат да предоставят отправка към валидността на образеца. Ако се появи специфично оцветяване във вътрешна тъкан за Negative Control, резултатите с пациентските проби ще се считат за невалидни.

Използването на контролен блок с множество тъкани, представляващи всички четири HER2 степени, може да е от полза за целите на осигуряване на тъкани за положителни и отрицателни контроли.

Пациентска тъкан – HER2 Negative Control

Използвайте доставената HER2 Negative Control вместо HER2 Primary Antibody върху съответната секция за всеки пациентски тест, за да оцените неспецифичното оцветяване и да позволите точно тълкуване на специфичното оцветяване на онкопротеина HER2 на антигенното място.

Пациентска тъкан – HER2 Primary Antibody

Положителната интензивност на оцветяване трябва да се оцени в рамките на контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване с HER2 Negative Control. както и при всеки имунохистохимичен тест отрицателният резултат значи, че антигенът не е открит, а не че антигенът не е наличен в изпитваните клетки/тъкани. Обърнете се към **Логическа обосновка на поръчката за скрийнинг на предметни стъкла, ограничения, оценка на представянето и Имунореактивност** за специфична информация по отношение на имунореактивността на Bond Oracle HER2 IHC System.

Проверка на образеца

Преди първоначалното използване на анти тяло или система за оцветяване в диагностична процедура потребителят трябва да провери специфичността на анти тялото като го тества върху редица амбулаторни тъкани с известни положителни и отрицателни имунохистохимични профили. Обърнете се към **Контрол на качеството** както преди това бе очертан и изискванията за качествен контрол на CAP Certification Program for Immunohistochemistry и/или CLSI (предишно NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12). Тези процедури за контрол на качеството трябва да се повтарят за всяка нова партида анти тяла или когато има промяна в параметрите на образеца. Човешка инвазивна (инфилтрираща се) дуктална гръдна карцинома с известни интензивности на оцветяване на онкопротеина HER2 от 0 до 3+ и други подходящи отрицателни тъкани са подходящи за проверката на образеца.

Тълкуване на оцветяването

За определянето на експресията на онкопротеина HER2 трябва да се оценяват само модела на мембранно оцветяване и интензивността като се използва скалата, представена в таблица 4. Патолог, използващ микроскоп със светло поле, трябва да извърши оценката на предметните стъкла. За оценка на имунохистохимичното оцветяване и за отбелязване е подходящ обектив с 10x увеличение. Обектив с 20–40x увеличаване трябва да се използва при потвърждаването на резултата. Цитоплазменото оцветяване трябва да се разглежда като неспецифично оцветяване и не трябва да се включва в оценката на интензивността на мембранното оцветяване (14). За помощ при диференцирането на 0, 1+, 2+ и 3+ оцветяване се обръщайте към Bond Oracle HER2 IHC System наръчника за тълкуване за представителни фигури на интензивности на оцветяване. Само проби от пациенти с инвазивна гръдна карцинома трябва да се оценяват. В случаите на карцинома *in situ* и инвазивна карцинома в една и съща проба, само инвазивният компонент трябва да се отбелязва.

Модел на имунохистохимично оцветяване	Резултат	Оценка
Не се наблюдава оцветяване или се наблюдава мембранно оцветяване в по-малко от 10% от туморните клетки.	0	Отрицателно
Бледо/почти недоловимо мембранно оцветяване се открива в над 10% от туморните клетки. Клетките се оцветяват само в част от мембраната си.	1+	Отрицателно
Слабо до умерено завършено мембранно оцветяване се наблюдава в над 10% от туморните клетки.	2+	Двусмислено (слабо положително)
Силно завършено мембранно оцветяване се наблюдава в над 10% от туморните клетки.	3+	Силно положително

Таблица 4. Тълкуване на HER2 оцветяването

Резултатите от оцветяване при Bond Oracle HER2 IHC System се тълкуват като отрицателни за експресия на онкопротеин HER2 с резултати от 0 и 1+ интензивност на оцветяване, двусмислени (слабо положителни) с резултат от 2+ интензивност на оцветяване и силно положителни с резултат от 3+ интензивност на оцветяване. Bond Oracle HER2 IHC System не е замислена да предоставя прогнозна информация на пациента и/или лекаря и не е валидирана за тази цел. За всяка оценка на оцветяване предметните стъкла трябва да се проверяват по реда, представен по-долу, за да се определи валидността на серията на оцветяване и да се позволи полуколичествена оценка на интензивността на оцветяване на мострата от тъкан.

Логическа обосновка на поръчката за скрининг на предметни стъкла

Предметните стъкла трябва да се наблюдават в следния ред:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Валиден образец с Oracle HER2 Control Slide показва следното:

- Наличие на силно кафяво завършено клетъчно мембранно оцветяване в 3+ контролна клетъчна линия SK-BR-3.
- Наличие на леко до умерено кафяво завършено клетъчно мембранно оцветяване в 2+ контролна клетъчна линия, MDA-MB-453.
- Наличие на бледо/почти недоловимо кафяво незавършено клетъчно мембранно оцветяване в 1+ контролна клетъчна линия, MDA-MB-175.
- Няма оцветяване в 0 контролна клетъчна линия MDA-MB-231.

Важна бележка: Характеристика на MDA-MB-175 1+ контролна клетъчна линия е отчетлив модел на растеж, при който клетките формират клъстери. Тези клъстери пораждаат постоянен луминален власинков граничен регион в клетъчния клъстер. Това власинково гранично оцветяване ще бъде по-силно от оцветяването на остатъка от клетъчната мембрана. Бледото/почти недоловимо незавършено клетъчно мембранно оцветяване е правилния 1+ модел за оцветяване на онкопротеина HER2. Точково имунооцветяване на региона на Голджи в цитоплазмата също може да се наблюдава в тази клетъчна линия.

2. Амбулаторна положителна контрола на тъкан – HER2 Primary Antibody

НАЛИЧИЕТО на кафяво мембранно оцветяване трябва да се наблюдава съгласно известния статус на онкопротеин HER2 на избраната положителна контрола.

3. В къща отрицателен компонент контрол на тъканта – HER2 Positive Control

ОТСЪСТВИЕТО на мембранно оцветяване трябва да се наблюдава. Компонент на отрицателна контролна тъкан потвърждава липсата на кръстосана реактивност на системата за откриване към специфично таргетираните клетки/клетъчни компоненти. Ако се появи мембранно оцветяване в компонент от тъкан за Negative Control, резултатите с пациентската проба ще се считат за невалидни.

4. Пациентска тъкан – оцветена с помощта на HER2 Negative Control

ОТСЪСТВИЕТО на мембранно оцветяване потвърждава специфичното обозначаване на целевия антиген от първото анти тяло. Друго кафяво оцветяване, получаващо се в цитоплазмата на пробата, третирана с HER2 Negative Control, като например в свързваща тъкан, левкоцити, еритроцити или некротична тъкан, трябва да се разглежда като неспецифично фоново оцветяване и трябва да се отбележи.

5. Пациентска тъкан – оцветена с помощта на HER2 Primary Antibody

Нивата на експресия на онкопротеина HER2 се определят от критериите, определени в таблица 4 и в наръчника за интерпретиране на Bond Oracle HER2 IHC System.

Ограничения

A. Общи ограничения

Имунохистохимията е лабораторно базиран многоетапен метод, използван за подпомагане на тълкуването и определянето на хистопатологичните характеристики. Това е метод, който изисква специализирано обучение по всички аспекти на процедурата (включително избора на подходящи реагенти, тъкан, фиксиране, обработка и подготовка на IHC предметно стъкло) и тълкуването.

Имунохистохимичното оцветяване на тъканта зависи от преместването, фиксирането и обработката на тъканта преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, разтопяване, измиване, изсушаване, нагряване, разделяне или замърсяването с други тъкани или течности може да доведе до артефакт, улавяне на анти тяло или погрешни отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации във фиксирането, методите на поставяне или на присъщите нередности в тъканта (15). Прекомерното или непълно контраоцветяване може също да застраши правилното тълкуване на резултатите.

Неспецифичното оцветяване, ако е налично, обикновено има разпръснат външен вид. Спорадичното оцветяване на свързваща тъкан може също да се наблюдава в секции от тъкани, фиксирани в прекалено много формалин. Използвайте незасегнати клетки за тълкуване на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерирани клетки често пъти се оцветяват неспецифично (16). Погрешни положителни резултати могат да се наблюдават поради неимунологично свързване на протеини или продукти на субстратна реакция. Те също така може да са причинени от ендогенни ензими като напр. псевдопероксидаза (еритроцити) или ендогенна пероксидаза (цитохром C), в зависимост от типа на използвано имунохистохимично оцветяване.

Тъканите от пациенти, заразени с вирус на Хепатит В и съдържащи повърхностен антиген на вируса на Хепатит В (HBsAg), могат да покажат неспецифично оцветяване с хрянова пероксидаза (17).

Неочаквано имунохистохимично оцветяване или промени в оцветяването могат да са резултат от изменения в нивата на експресия на кодиращите гени или антигени. Всяка промяна в очакваните модели на оцветяване трябва да се тълкува във връзка с всички други диагностични изследвания.

Тълкуването на имунохистохимичното оцветяване трябва да е съпътствано от морфологични изследвания и от използването на подходящ контролен материал и трябва да се оценява от квалифициран патолог в рамките на контекста на клиничната анамнеза на пациента и на други диагностични тестове.

Представянето на образеца (т.е. оценките на адекватността на положителните и отрицателни контроли) и тълкуването на всяко имунохистохимично оцветяване или неговата липса трябва да се извършват в надлежно акредитирана/лицензирана лаборатория под контрола на подходящо квалифициран и опитен патолог, който е отговорен за цялостната оценка на имунохистохимичния образец и неговото тълкуване.

B. Специфични за продукта ограничения

Този продукт не е замислен за употреба в течната цитометрия. Характеристики на представянето не са определени за течна цитометрия.

Погрешни отрицателни резултати могат да се видят като следствие от деградацията на антигени в тъканната секция. Предметните стъкла, необходими за оценка на онкопротеина HER2 и за проверка за тумор, трябва да са подготвени по едно и също време. За запазване на антигенността секциите от тъкани, закрепени върху предметните стъкла (Leica BOND Plus Slides – продукти код S21.2113) трябва да се оцветят в рамките на 4–6 седмици от разделянето, ако се държат при стайна температура (18–

24 °C). След разделянето се препоръчва предметните стъкла да се инкубират за 12–18 часа (през нощта) при 37 °C. Секциите, които изискват по-нататъшно слепване, могат да се инкубират при 60 °C за още един час.

Минимална естествена вариация на имунохистохимичния профил ще се наблюдава между партидите на растеж на клетъчните линии, използвани в Bond Oracle HER2 IHC System. Тази естествена вариация е в рамките на приемливите нива на толеранс на биологичната единица и не засяга тълкуването или представянето на системата.

Характеризацията на клетъчните линии с помощта на течна цитометрия и *in situ* хибридизация, както е представено в таблица 5, също е предмет на естествена биологична вариация. Също така се докладват техническа вариация и вариация при тълкуването на контролните клетъчни линии, оценявани чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (18).

Оценката на HER2 Control Slides трябва да взема под внимание всички релевантни срокове на годност. Съхранявайте Bond Oracle HER2 IHC System при 2–8 °C. Да не се замразява. Да се върне до температура от 2–8 °C непосредствено след употреба. Всякакви отклонения от тези условия ще направят образеца невалиден.

Не заменяйте реагентите на Bond Oracle HER2 IHC System с други компоненти, независимо дали са доставени от Leica Biosystems или от други производители. Това ще доведе до инвалидиране на образеца.

Важно е всички стъпки, очертани в разделите от С до Е (Процедура), да се извършват в предписания ред. Всяко отклонение от този ред ще направи образеца невалиден.

Важно е в образеца да се изпълват тъкани, които са фиксирани само във фиксатори на формалинова основа. Използването на друг тип фиксатор ще инвалидира образеца.

Секциите на тъкани, изрязани извън препоръчвания диапазон на дебелина, не са валидирани. Използването на друга дебелина на секция може да инвалидира образеца.

Данни за клетъчна линия

Клетъчна линия	Bond Oracle HER2 IHC System профил	HER2 рецепторно натоварване на клетка*	HER2 статус на гена амплификация*	
			HER2 число на копието	HER2:Chr17 генно съотношение
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

*HER2 анализ на рецепторно натоварване според оцененото от течната цитометрия. *HER2 статус на гена амплификация според оцененото от двойната проба (HER2:хромозома 17) РИБА.

Таблица 5. Профил на HER2 Control Slide

Клинично съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System c/y Dako HercepTest

Част първа от изследването разглежда пригодността на Bond Oracle HER2 IHC System за употреба като помощно средство при определянето на лечение с терапия с Herceptin® (trastuzumab). Изследването беше разработено за разглеждане на съгласуването между Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest, разглеждан като 'златен стандарт' за

този образец. Критерият за приемане беше дефиниран като по-голямо от 75% цялостно съгласуване между двата теста с 95% интервал на доверие (CI).

Изследването беше проведено като оценка на сляпо в два центъра, базирана в САЩ. Всеки център за изследване получи фиксирани във формалин включени в парафин мостри с рак на гърдата, имащи известен HER2 статус. Капсулите бяха избрани в обратен последователен ред от клиничните архиви, представляващи последователното вкарване на капсули в хистопатологичния отдел за клинично тестване, а след това бяха тествани независимо от другите прогнозни и/или предсказуеми фактори, без да има пристрастия към групата. Групи от 160 и 292 проби са тествани съответно в център 1 и център 2. Всяка група имаше равно представяне на двусмислени/положителни (2+, 3+) и отрицателни (0, 1+) капсули на базата на преди това зададени HER2 IHC оценки, което води до обща популация за изследването от 452 мостри. Дванадесет мостри бяха сметнати за неподходящи поради липса на достатъчно инвазивен тумор и бяха отстранени от изследването. Други девет мостри не можаха да бъдат отбелязани в резултат на повдигната тъкан от повърхността на предметното стъкло, което е довело до окончателна популация на изследването от 431 мостри.

Всички капсули бяха оцветени с HercepTest съгласно инструкциите на производителя, посочени на листовката в опаковката. Последващи секции от всяка капсула бяха оцветени с Bond Oracle HER2 IHC System върху Leica Biosystems' BOND напълно автоматизирана и усъвършенствана система за оцветяване. Всички капсули бяха отделени от уникална идентифицираща пациента информация и бяха придружавани от клинични данни относно размера на тумора, етапа на тумора, класа на тумора и статуса на рецептора за естроген. Всички оцветени предметни стъкла бяха маскирани и оценени по произволен начин от обучени наблюдатели в два центъра. За анализа на 2x2 съгласуване резултатите бяха тълкувани като отрицателни, ако оцветяването беше 0 или 1+ и положителни за оценки от 2+ или 3+. За анализа на 3x3 съгласуване резултатите бяха тълкувани като отрицателни, ако оцветяването беше 0 или 1+, двусмислени за оценки от 2+ и положителни за оценки от 3+. След това данните бяха анализирани за договаряне на положително оцветяване и договаряне на отрицателно оцветяване.

Резултати от 2x2 съгласуване

В този първоначален анализ тестовите резултати от двата теста (Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest) са категоризирани като отрицателни (0,1+) или положителни (2+, 3+). Честотите на четирите възможни комбинации са показани в табличен формат 2x2 (вж. таблица 6). След това общата оценка на съгласуване на базата на тази 2x2 таблица беше изчислена заедно с 95% интервал на точно съвпадение (на базата на биномна дистрибуция).

Нулевата хипотеза (H_0), спрямо която са зададени критериите за успех, гласи, че съгласуването не е по-голямо от 75%.

Наблюдаваното съвпадение за 431 мостри между двата теста в 2x2 анализ показва съгласуване на 92,34% (398/431) с 95% CI от 89,42% - 94,67%. Тези данни подкрепят отхвърлянето на нулевата хипотеза (H_0), че съвпадението е не по-голямо от 75%, с p -стойност < 0,0001.

Процентът положително съвпадение (чувствителност) или способността на Bond Oracle HER2 IHC System правилно да идентифицира HercepTest положителни капсули (процентът от пробите, оценени като положителни от Bond Oracle HER2 IHC System и HercepTest спрямо всички HercepTest положителни капсули) беше 84,87% (129/152) с 95% CI от 78,17%-90,16%. Процентът отрицателно съвпадение (специфичност) или способността на теста правилно да идентифицира HercepTest отрицателни капсули (процентът от пробите, оценени като отрицателни от Bond Oracle HER2 IHC System и HercepTest спрямо всички HercepTest отрицателни капсули) беше 96,42% (269/279) с 95% CI от 93,51%-98,27%.

		HercepTest		
		Отрицателно	Положително	Общо
Bond Oracle HER2 IHC System	Отрицателно	269	23	292
	Положително	10	129	139
	Общо	279	152	431

2x2 съгласуване (95% CI) = 92,34% (89,42 до 94,67%); $p < 0,0001$

Таблица 6. 2x2 съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System с HercepTest

Резултати от 3x3 съгласуване

Данните бяха групирани като отрицателни (0 или 1+), двусмислени (2+) или положителни (3+) за 3x3 анализ и показаха съгласуване от 86,54% (373/431) с 95% CI от 82,95% до 89,62%. Ето защо нулевата хипотеза (H_0), че съпадението е не по-голямо от 75%, бе отхвърлена с p -стойност $< 0,0001$.

Процентът положително съпадение за 3+ (процентът на пробите от пробите, оценени като 3+ положителни от Bond Oracle HER2 IHC System и HercepTest спрямо всички 3+ HercepTest положителни капсули) в това изследване беше 73,33% (66/90) с 95% CI от 62,97% до 82,11%. Процентът отрицателно съпадение беше 96,42% (269/279) с 95% CI от 93,51% до 98,27. Вж. таблица 7.

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

3x3 съгласуване (95% CI) = 86,54% (82,95% до 89,62%); $p < 0,0001$

Таблица 7. 3x3 съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System с HercepTest

В заключение генерираните в настоящото изследване данни показват, че Bond Oracle HER2 IHC System може да се използва като мощно средство при определянето на лечението за терапия с Herceptin® (trastuzumab) на базата на съгласуването си с HercepTest.

Клинично съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System с PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Част 2 от изследването беше замислена да разгледа съгласуването между Bond Oracle HER2 IHC System и комплекта за ДНК проби Abbott Molecular PathVysion HER-2, разглеждан като 'златен стандарт' за рефлексните образи за генна оценка, използвани във връзка с HER2 имунохистохимията.

Настоящото изследване бе извършено в същите изследователски центрове и със същата група на изследване, както и при Част 1. Всички капсули бяха оцветени с комплекта за ДНК проби Abbott Molecular PathVysion HER-2 съгласно инструкциите на производителя, посочени на листовката в опаковката. Последващи секции от всяка капсула бяха оцветени с Bond Oracle HER2 IHC System върху напълно автоматизирана и усъвършенствана система за оцветяване на BOND (от част 1 от клиничното изследване). От 431 оцветени

капсули не беше получен резултат в три случая поради недостатъчна хибридизация на пробата, което доведе до обща група от 428 капсули.

Всички оцветени предметни стъкла бяха оценени от обучени наблюдатели на два центъра за изследване. За анализ на 3x2 съгласуване резултатите бяха тълкувани като отрицателни, ако HER2/CEP17 съотношението на гена амплификация е по-малко от ($<$) 2.0 или положителни, ако е по-голямо или равно на ($>$) 2.0 след преброяване на 20 туморни клетки.

Резултати от 3x2 съгласуване

Наблюдаваното съвпадение за 428 мостри между двата теста в 3x2 анализ показва съгласуване на 87,6% (375/428) с 95% CI от 84% до 90%.

Процентът положително съвпадение (чувствителност) или способността на Bond Oracle HER2 IHC System правилно да идентифицира PathVysion положителни капсули (процентът от пробите, оценени като положителни от Bond Oracle HER2 IHC System и PathVysion спрямо всички PathVysion положителни капсули) беше 93,8% (61+30/97) с 95% CI от 86,8% до 97,4%.

Процентът отрицателно съвпадение (специфичност) или способността на теста правилно да идентифицира PathVysion отрицателни капсули (процентът от пробите, оценени като отрицателни от Bond Oracle HER2 IHC System и PathVysion спрямо всички PathVysion отрицателни капсули) беше 85,8% (284/331) с 95% CI от 81,6% до 89,2%. Вж. таблица 8.

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

Общо съгласуване (95% CI) = 87,6% (84 до 90%)

Таблица 8. 3x2 съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System оцветяване с/у PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.

Имунореактивност – Нормален набор

Нормален тип тъкан	Модел на оцветяване	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Надбъбречна жлеза	Отрицателно	Отрицателно
Мозък, малък мозък	Отрицателно	Отрицателно
Мозък, главен мозък	Отрицателно	Отрицателно
Гърди	Отрицателно	Отрицателно
Костен мозък	Отрицателно	Отрицателно
Колон	Отрицателно	Отрицателно
Хранопровод	Отрицателно	Отрицателно
Око	Отрицателно	Отрицателно
Хипофизна жлеза	Умерено цитоплазмено оцветяване наблюдавано в клетки на хипофизната жлеза (1/3)	Отрицателно
Бъбрек	Отрицателно	Отрицателно
Ларинкс	Отрицателно	Отрицателно
Черен дроб	Отрицателно	Отрицателно
Бял дроб	Отрицателно	Отрицателно
Мезотелий	Отрицателно	Отрицателно
Яйчник	Отрицателно	Отрицателно
Панкреас	Отрицателно	Отрицателно
Паразитовидна жлеза	Отрицателно	Отрицателно
Периферен нерв	Отрицателно	Отрицателно
Простата	Отрицателно	Отрицателно
Слюнчена жлеза	Отрицателно	Отрицателно
Кожа	Отрицателно	Отрицателно
Тънко черво	Отрицателно	Отрицателно
Далак	Отрицателно	Отрицателно
Стомах	Слабо цитоплазмено оцветяване наблюдавано в клетки на стомашните жлези (2/3)	Отрицателно
Напречен мускул	Отрицателно	Отрицателно
Тестис	Отрицателно	Отрицателно
Тимус	Отрицателно	Отрицателно
Щитовидна жлеза	Отрицателно	Отрицателно
Сливца	Отрицателно	Отрицателно
Шийка на матката	Отрицателно	Отрицателно
Матка	Отрицателно	Отрицателно

Таблица 9. Нормален набор на оцветяване

Изследване на възпроизводимостта

Тестване с точност на резултатите в една и в няколко серии

Прецизно тестване бе извършено в Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Използваната тъкан бе фиксирана във формалин включена в парафин композитна тъкан от микро групи (TMA), предоставена от Isu Abxix (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), състояща се от 20 тъканни ядра с диаметър от 4 мм и инвазивна гръдна карцинома. 20-те капсули бяха избрани на базата на преди това зададени HER2 оценки. На тази основа х5 капсули от HER2 3+, х5 капсули от HER2 2+, х5 капсули от HER2 1+ и х5 капсули от HER2 0 бяха включени.

A. Тестване с точност на резултатите в една серия

При тестването на точността на резултатите в една серия на Bond Oracle HER2 IHC Systems беше извършена оценка върху общо 40 последователни секции от TMA, включващи 20 инвазивни гръдни тумора и 40 HER2 Control Slides. Всички предметни стъкла бяха оцветени с Bond Oracle HER2 IHC System върху напълно автоматизирана усъвършенствана система за оцветяване на BOND. Секциите бяха оцветени в продължение на непрекъснат период с помощта на Bond Oracle HER2 IHC System и бяха от една и съща производствена партида. Оцветените секции бяха оценени на сяло и по произволен начин от опитен наблюдател с цел определяне на точността на резултатите в дадената серия.

Оценка на предметните стъкла от изследването на резултатите в серията посочи, че 733/800 (91,63%) от тестовите точки на измерване могат да се тълкуват. 40 точки на измерване бяха изключени поради наличието само на DCIS, а допълнителни 27 точки на измерване не бяха тълкувани поради загуба на инвазивен тумор (специфично за 3 ядра). Вариация в оцветяването се появи в 61 (8,32%) от възможни 733 събития на оцветяване. При 37 случая беше наблюдавана вариация от 3+ до 2+ (n = 20) и от 1+ до 0 (n = 17) и следователно тя не би представлявала промяна от клинично положително към клинично отрицателно или обратно при 2x2 оценка на данните. Останалите 24 (3,27%) случая представляваха промяна от клинично отрицателно (0 или 1+) към клинично положително (2+ or 3+). Стойност на преминаване = 96,7% (95% CI = 95,15% до 97,81%).

B. Тестване с точност на резултатите в няколко серии

При тестването на точността на резултатите в няколко серии на Bond Oracle HER2 IHC System беше извършена оценка върху общо 24 последователни секции взети от TMA, включващи 20 инвазивни гръдни тумора и 24 HER2 Control Slides. Всички предметни стъкла бяха оцветени с Bond Oracle HER2 IHC System върху напълно автоматизирана усъвършенствана система за оцветяване на BOND. Предметните стъкла бяха оценени в 8 независими серии, извършени в една и съща лаборатория при три отделни случая с помощта на Bond Oracle HER2 IHC System от една и съща производствена партида. Оцветените предметни стъкла бяха оценени на сяло и по произволен начин от опитен наблюдател с цел определяне на точността на резултатите в няколко серии.

Оценка на предметните стъкла от изследването на резултатите в няколко серии посочи, че 456/480 (95,00%) от тестовите точки на измерване могат да се тълкуват. 24 точки на измерване не можаха да се тълкуват поради загуба на инвазивен тумор (специфично за 5 ядра). Вариация в оцветяването се появи в 42 (9,21%) от възможни 456 точки на измерване. При 30 събития беше наблюдавана вариация от 3+ to 2+ (n = 10) и от 1+ to 0 (n = 20) и следователно тя не би представлявала промяна от клинично положително към клинично отрицателно или обратно при 2x2 оценка на данните. Останалите 12 (2,63%) представляваха промяна от клинично отрицателно (0 или 1+) към клинично положително (2+ or 3+). Стойност на преминаване = 97,37% (95% CI = 95,90% до 98,77%).

C. Възпроизводимост от серия в серия

За определяне на възпроизводимостта от серия в серия 3 серии Bond Oracle HER2 IHC Systems бяха произведени при GMP по 3 различни повода и бяха оценени при 24 секции с тумор на гърдата (24 точки на измерване), взети от четири различни фиксирани във формалин включени в парафин тъканни блока (представляващи интензивности на оцветяване 0, 1+, 2+ и 3+ HER2) и три HER2 Control Slides (12 контролни точки на измерване). Три независими серии бяха извършени в една и съща лаборатория при три отделни случая, като при всяка се използваше отделна производствена партида Bond Oracle HER2 IHC System. Всички предметни стъкла бяха оцветени с BOND Oracle HER2 IHC System върху напълно автоматизирана усъвършенствана система за оцветяване на BOND. Оцветените предметни стъкла бяха маскирани и оценени по произволен начин от обучен наблюдател с цел определяне на възпроизводимостта от серия в серия.

Оценка на предметните стъкла (тестове и контроли) от изследването на серия в серия посочи, че 36/36 от точките на измерване могат да се тълкуват. Не се получи вариация в оцветяването в 36-те точки на измерване между трите различни производствени партиди на Bond Oracle HER2 IHC System. Оцветяването с Bond Oracle HER2 IHC System е консистентно при производствените партиди.

D. Междулабораторна възпроизводимост

Тестването на междулабораторната възпроизводимост на Bond Oracle HER2 IHC System беше оценено в 3 центъра - Leica Biosystems Newcastle Ltd (център А) и две независими лаборатории (центрове В и С) при общо 192 секции от TMA, включващи 20 инвазивни гръдни тумора и 24 HER2 Control Slides. От 192 оцветени TMA секции 96 бяха оцветени с HER2 Primary Antibody и 96 с реагент за HER2 Negative Control. Всички предметни стъкла бяха оцветени с Bond Oracle HER2 IHC System върху напълно автоматизирана усъвършенствана система за оцветяване на BOND. Предметните стъкла бяха оценени в 8 независими серии, извършени във всяко едно от 3-те различни центъра за изследване с помощта на Bond Oracle HER2 IHC System от една и съща производствена партида. Оцветените предметни стъкла бяха оценени на сяпю и по произволен начин от опитен наблюдател в Leica Biosystems, Newcastle Ltd с цел определяне на междулабораторната възпроизводимост.

Оценка на предметните стъкла от изследването на междулабораторната възпроизводимост посочи, че 1477/1920 (76,93%) от тестовите точки на измерване могат да се тълкуват. 443 тестови точки на измерване не можах да се тълкуват поради:

- а) Неадекватно представяне на HER2 контролното предметно стъкло при 2/24 случая, водещо до отстраняване на 2 серии/160 тестови точки на измерване. Това събитие се случи веднъж в център А и веднъж в център В (80 тестови точки на измерване от всеки център на изследване бяха отстранени).
- б) Отклонение от тестовия план в център С, при което 24 предметни стъкла общо бяха ръчно контраоцветени с Nematohylin след оцветяване с Bond Oracle HER2 IHC System. Това доведе до превишено контраоцветяване както на HER2 контролните предметни стъкла, така и на TMA тестовите точки на измерване и 240 точки на измерване бяха отстранени.
- в) Загуба на инвазивен тумор, водеща до отстраняване на 23 тестови точки на измерване. Това събитие се появи по 23 повода в център А и беше директен резултат от загубата на тъкан в TMA блока при производството на 192 последователни TMA секции, необходими за завършване на това изследване.
- г) Неподлежащо на тълкуване оцветяване поради неадекватно измиване от напълно автоматичната усъвършенствана система за оцветяване на BOND, довело до отстраняване на 20 точки на измерване.

Оценка на подлежащите на тълкуване предметни стъкла в изследването за междулабораторна точност посочи, че вариация при оцветяването се е получила при 79 (5,28%) от възможни 1477 събития на оцветяване. От тях 14/1477 (0,95%) случая представляват вариации от 0 до 1+ или 2+ до 3+ и така те не представляват промяна от клинично положително към клинично отрицателно или обратно при 2x2 оценка на данните. Стойност на преминаване = 99,05% (95% CI = 98,42% до 99,46%). От 14 събития по оцветяване 5/1477 (0,34%) събития по оцветяване са се получили в Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (център А), 8/1477 (0,54%) са се получили в център В и 1/1477 (0,07%) се е получило в център С.

Останалите 65/1477 (4,40%) събития по оцветяване са показали вариация от 2+ до 1+ или 2+ до 0 и следователно биха представлявали промяна от клинично положително към клинично отрицателно или обратно при 2x2 оценка на данните. Стойност на преминаване = 95,6% (95% CI = 94,42% до 96,54%). От 65-те клинично важни промени 11/65 (16,9%) са се получили в Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (център А), 24/65 (36,9%) са се получили в център В и 30/65 (46,1%) са се получили в център С. От клинично важните промени не е имало случай на 3+ промяна в отрицателен (0 или 1+) резултат или обратно.

E. Възпроизводимост между наблюдателите

40 произволно избрани капсули с инвазивен рак на гърдата, предоставящи равно разпределение на всяка от степените на HER2 IHC (проби от ресекция) бяха последователно отделени и предоставени на Leica Biosystems, Newcastle Ltd (център А), център В и център С за оцветяване и тълкуване. Секциите бяха оценявани на сяпо и произволно във всеки център. Съвпадението между наблюдатели на двете независими клинични центрове, център В и център С, беше 87,5% (95% CI = 73,3% до 95,8%). Съвпадението между център В и център С и Leica Biosystems Newcastle, Ltd беше 92,5% (95% CI = 79,6% до 98,4%) и 85% (95% CI = 70,1% до 94,29%) респективно. Анализът на общото координиране между тримата наблюдателя (А, В, С) е 82,50%.

F. Точност между инструментите (BOND-MAX с/у BOND-III)

Тестването на точността между инструментите с помощта Bond Oracle HER2 IHC System беше извършено в независим европейски изследващ център. Тестваните мостри бяха получени от фиксирани във формалин включени в парафин цели секции от сто тридесет и осем (138) капсули с инвазивен рак на гърдата (проби с игла от ядрото и с ресекция). Тестването между инструментите беше извършване в съответствие с очаквания на центъра за изследване с оцветяване на последователни секции върху платформите BOND-MAX и BOND-III. Три капсули бяха разгледани като неподходящи поради наличността мостра/тумор, несъответстващи на изследването.

Идентични партидни номера на Bond Oracle HER2 IHC System и BOND Instrument спомогателни реагенти бяха използвани за всеки инструмент. Раздели се оцветяват със задна дата. Предметните стъкла бяха тълкувани в центъра за изследване от опитен наблюдател, за да се определи точността между инструментите.

Оценка на предметните стъкла за точност между инструментите показва 2x2 съгласуване между положително (2+, 3+) и отрицателно (0, 1+) от 94,2% (130/138) с 95% CI от 88,9 до 97,5% и 3x3 съгласуване между положително (3+), двусмислено (2+) и отрицателно (0, 1+) съответствие от 87,0% (120/138) с 95% CI от 80,2 до 92,1%.

		BOND-MAX		
		Отрицателно (0/1+)	Положително (2/3+)	Общо
BOND-III	Отрицателно (0/1+)	80	1	81
	Положително (2/3+)	7	50	57
	Общо	87	51	138

Общо съгласуване (95% CI) = 94,2% (88,9 до 97,5%)

Таблица 10. 2x2 съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System оцветяване при BOND-MAX с/у BOND-III платформи.

		BOND-MAX			
		Отрицателно (0/1+)	Двусмислено (2+)	Положително (3+)	Общо
BOND-III	Отрицателно (0/1+)	80	1	0	81
	Двусмислено (2+)	6	5	1	12
	Положително (3+)	1	9	35	45
	Общо	87	15	36	138

Общо съгласуване (95% CI) = 87,0% (80,2 до 92,1%)

Таблица 11. 3x3 съгласуване на Bond Oracle HER2 IHC System оцветяване при BOND-MAX с/у BOND-III платформи.

В заключение данните, генерирани в това изследване, показват високо ниво на съгласуване между BOND-MAX и BOND-III системите на Leica Biosystems, когато се оценяват с използването на Bond Oracle HER2 IHC System.

Разрешаване на проблеми

Проблем	Вероятна причина	Коригиращо действие
Няма имунохистохимично оцветяване	Серията е прекратена преди завършване	Използвайте софтуера на BOND потвърдете наличието на подлежащи на докладване грешки по време на серията на оцветяване и действайте според инструкциите на софтуера на BOND.
	Неправилен избор на протокол	Уверете се, че е зададен по подразбиране *IHC Protocol H в полето за протокол за оцветяване на диалоговия прозорец "Добави предметно стъкло".
	Неадекватна депарафинизация на предметните стъкла	Уверете се, че е избран режим *Dewax в полето "Подготовка" на диалоговия прозорец "Добави предметно стъкло".
	Разпръснати са неподходящи насипни реагенти	Уверете се, че всички BOND реагенти са разпределени в подходящите насипни контейнери и поставени в правилните позиции на инструмента.
	Замърсяване на BOND разтвора за измиване с натриев азид	Използвайте пресен BOND Wash Solution, подготвен до подходящата работна плътност.
Слабо специфично имунохистохимично оцветяване	Неподходящо извличане на епитоп	Уверете се, че подходящите реагенти на BOND Epitope Retrieval са разпределени в правилните насипни контейнери и че софтуерът на BOND по подразбиране е зададен на съответния протокол за извличане на епитоп, *HIER 25 min *ER1 (97) .
	Неподходящо фиксиране или обработка на тестова проба	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че графициите за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване.
	Bond Oracle HER2 IHC System се използва извън нейния срок на годност	Уверете се, че използваната Bond Oracle HER2 IHC System е в рамките на посочения срок на годност.

Прекомерно специфично имунохистохимично оцветяване	Неподходящо извличане на епитоп	Уверете се, че подходящите реагенти на BOND Epitope Retrieval са разпределени в правилните насипни контейнери и че софтуерът на BOND по подразбиране е зададен на *HIER 25 min ER1 (97) .
	Вариация при фиксирането	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че графициите за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване. Ако е възможно, тествайте повторно капсулата с помощта на друг блок. Ако това не е възможно, оценете зоните, които показват най-добри модели на фиксиране във връзка със съответната H&E оцветена секция.
Неспецифично фоново оцветяване	Разпръснати са неподходящи насипни реагенти	Уверете се, че всички BOND реагенти са разпределени в подходящите насипни контейнери и поставени в правилните позиции на инструмента.
	Неадекватна депарафинизация на предметните стъкла	Уверете се, че е избрано *Dewax в полето "Подготовка" на диалоговия прозорец "Добави предметно стъкло".
	Неспецифична имунохистохимична кръстосана реакция в тъканта	Обърнете се към Bond Oracle HER2 IHC System описанието на нормалната кръстосана реактивност на тъканите (обърнете се към таблица 9).
	Неспецифична имунохистохимична кръстосана реакция със зони с тъканна некроза	Уверете се, че е използван фиксатор на базата на формалин и че графициите за обработка са подходящи за пробата, която се подлага на тестване. Ако е възможно, тествайте повторно капсулата с помощта на друг блок. Ако това не е възможно, оценете във връзка със съответната H&E оцветена секция зоните, които показват най-добри модели на фиксиране.
	Изушаване на артефакт след завършването на серията на оцветяване	Ако предметните стъкла трябва да се поставят за нощна серия, препоръчва се да се използва функционалността на BOND за отложен старт. Уверете се, че има адекватно количество дистилирана или дейонизирана вода, което да стигне за предметните стъкла за този период и да се гарантира, че предметните стъкла няма да изсъхнат.
	Секции, прилепнали към предметни стъкла с помощта на скорбялни добавки	Използвайте предметни стъкла без скорбяла (напр. Leica BOND Plus Slides – продуктов код S21.2113).

Тъканта е отстранена от пациентското/ Control Slide(a)	Използване на неправилен тип предметни стъкла или неадекватно сушене на секция	Уверете се, че се използват подходящите предметни стъкла за пациентските/контролни секции (напр. Leica BOND Plus Slides – продуктов код S21.2113). Уверете се, че предметните стъкла получават адекватно изсушаване и се инкубират за 12–18 часа при 37 °C (през нощта). Секциите, които се нуждаят от допълнително слепване, може да се инкубират при 60 °C за още един час.
---	--	---

Таблица 12. Bond Oracle HER2 IHC System наръчник за разрешаване на проблеми.

Ако има проблеми, свързани с Bond Oracle HER2 IHC System, които да попадат извън обхвата на наръчника за разрешаване на проблеми (обърнете се към таблица 12), моля, свържете се за помощ с вашия локален технически сервизен отдел на Leica Biosystems или с дистрибутора.

Референции

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990; 17: 234-247.
- Национална комисия за клинични лабораторни стандарти (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
- 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.
- 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.

15. Nadjji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
16. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry, 2007* (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
17. 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.
18. 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.

Изменение спрямо предишната версия

Точност между инструментите (BOND-MAX c/y BOND-III).

Дата на издаване

22 Февруари 2017

Идентификация на символите

	Партиден код		Съхранение		Каталожен номер
	Медицинско устройство за in vitro диагностика		Производител		Чупливо
	За употреба прегледайте инструкциите		Съдържа достатъчно за <n> броя тестове		Да се използва до ГГГГ-ММ-ДД
SN	Сериен номер				

HercepTest™ е търговска марка на и обект на лицензи, притежавани от DakoCytomation, Denmark A/S Herceptin® е търговска марка на Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd.