

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Οδηγίες χρήσης

Για χρήση με το πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης Leica Biosystems' BOND.

To Product Code TA9145 έχει σχεδιαστεί για χρώση 60 εξετάσεων (150 αντικειμενοφόρων πλακών):

60 αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης με HER2 Primary Antibody

60 αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης με HER2 Negative Control

15 Αντικειμενοφόροι πλάκες μάρτυρα HER2 με HER2 Primary Antibody

15 Ιστοί θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου με HER2 Primary Antibody



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



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

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

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

Περιεχόμενα

Προοριζόμενη χρήση	3
Σύνοψη και ερμηνεία	3
Βασικές αρχές	3
Έκφραση της HER2	3
Σύνοψη κλινικής συμφωνίας	3
Αρχή της διαδικασίας	4
Παρεχόμενα συστατικά	4
Οδηγίες χρήσης	5
Φύλαξη και σταθερότητα	5
Προετοιμασία ιστοτεμαχίου	5
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	5
Διαδικασία	6
A. Απαιτούμενα αντιδραστήρια που δεν παρέχονται	6
B. Απαιτούμενος εξοπλισμός που δεν παρέχεται	6
Γ. Μεθοδολογία	6
Δ. Διαμόρφωση αντικειμενοφόρων πλακών	6
Ε. Βήματα της διαδικασίας	7
Ποιοτικός έλεγχος	10
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	10
Ιστός θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody	10
Συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody	11
Ιστός ασθενούς – HER2 Negative Control	11
Ιστός ασθενούς – HER2 Primary Antibody	11
Επικύρωση του προσδιορισμού	11
Ερμηνεία της χρώσης	12
Τεκμηρίωση της ακολουθούμενης σειράς ελέγχου των αντικειμενοφόρων πλακών	12
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	12
2. Ιστός θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody	13
3. Συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Positive Control	13
4. Ιστός ασθενούς – χρωσμένος με HER2 Negative Control	13
5. Ιστός ασθενούς – χρωσμένος με το HER2 Primary Antibody	13
Περιορισμοί	13
A. Γενικοί περιορισμοί	13
B. Ειδικό για το προϊόν περιορισμοί	14
Δεδομένα κυτταρικών σειρών	15
Κλινική συμφωνία των Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest	15
Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2	16
Αποτελέσματα συμφωνίας 3x3	16
Κλινική συμφωνία του Bond Oracle HER2 IHC System v PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	17
Αποτελέσματα συμφωνίας 3x2	17
Ανοσοαντιδραστικότητα – Κατάλογος φυσιολογικών ιστών	18
Μελέτη αναπαραγωγιμότητας	19
Έλεγχος ακρίβειας εντός εκτέλεσης και μεταξύ εκτελέσεων	19
A. Έλεγχος ακρίβειας εντός της εκτέλεσης	19
B. Έλεγχος ακρίβειας μεταξύ εκτελέσεων	19
Γ. Αναπαραγωγιμότητα παρτίδας προς παρτίδα	19
Δ. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων	20
Ε. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ γνωματευόντων	21
Σ. Ακρίβεια μεταξύ οργάνων (BOND-MAX v BOND-III)	21
Αντιμετώπιση προβλημάτων	22
Βιβλιογραφία	24

Προοριζόμενη χρήση

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Το Bond Oracle HER2 IHC System είναι ένας ημι-ποσοτικός, ανοσοϊστοχημικός (IBC) προσδιορισμός για τον καθορισμό της κατάστασης ογκοπρωτεΐνης HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) σε ιστό καρκίνου του μαστού που έχει υποβληθεί σε επεξεργασία για ιστολογική αξιολόγηση. Το Bond Oracle HER2 IHC System προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην αξιολόγηση ασθενών, για τους οποίους εξετάζεται το ενδεχόμενο θεραπείας με Herceptin® (trastuzumab) (βλ. φύλλο οδηγιών χρήσης Herceptin®).

Σημείωση: Όλοι οι ασθενείς στις κλινικές δοκιμές του Herceptin® επιλέχθηκαν βάση ενός ερευνητικού ανοσοκυτταροχημικού Προσδιορισμού κλινικής δοκιμής (CTA). Κανένας από τους ασθενείς σε αυτές τις δοκιμές δεν επιλέχθηκε με χρήση του Bond Oracle HER2 IHC System. Το Bond Oracle HER2 IHC System έχει συγκριθεί με το Dako HercepTest™ σε ανεξάρτητη ομάδα δειγμάτων και φάνηκε να παράγει αποδεκτά αποτελέσματα συμφωνίας, όπως φαίνεται στη Σύνοψη κλινικής συμφωνίας. Η πραγματική συσχέτιση του Bond Oracle HER2 IHC System με την κλινική έκβαση δεν έχει καταδειχθεί.

Σύνοψη και ερμηνεία

Βασικές αρχές

Το Bond Oracle HER2 IHC System περιέχει τον κλώνο CB11 του μονοκλωνικού αντι-HER2 αντισώματος ποντικού. Ο κλώνος CB11, που αναπτύχθηκε αρχικά από τους Corbett et al (1) και κατασκευάστηκε από την Novocastra Laboratories Ltd (πλέον Leica Biosystems Newcastle Ltd), στρέφεται κατά της εσωτερικής περιοχής της ογκοπρωτεΐνης HER2.

Σε ένα ποσοστό ασθενών με καρκίνο του μαστού, η ογκοπρωτεΐνη HER2 υπερεκφράζεται ως μέρος της διαδικασίας της κακοήθους εξαλλαγής του όγκου και της εξέλιξής του (2). Η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER2 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού καθιστά την HER2 έναν πιθανό στόχο μίας βασιζόμενης σε αντισώματα θεραπείας. Το Herceptin® είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα (3) που προσδένεται με υψηλή συγγένεια στην ογκοπρωτεΐνη HER2 και έχει φανεί πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων νεοπλαστικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την ογκοπρωτεΐνη HER2 τόσο in vitro όσο και in vivo (4–6).

Από την πρώτη τεχνική ανοσουπεροξειδάσης, που δημοσιεύτηκε από τους Nakane και Pierce (7), έχουν σημειωθεί πολυάριθμες εξελίξεις στο πεδίο της ανοσοϊστοχημείας, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας. Μία πρόσφατη εξέλιξη είναι και η χρήση πολυμερικής σήμανσης. Αυτή η τεχνολογία έχει εφαρμοστεί τόσο σε πρωτογενή αντισώματα όσο και σε ανοσοϊστοχημικά συστήματα ανίχνευσης (8). Το σύστημα ανίχνευσης Compact Polymer™ που χρησιμοποιείται από το Bond Oracle HER2 IHC System, αποτελεί μέρος μίας γκάμας καινοτόμων τεχνολογιών ελεγχόμενου πολυμερισμού που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την προετοιμασία πολυμερικών συμπλόκων αντισωμάτων σύνδεσης στην HRP. Χάρη σε αυτήν την τεχνολογία πολυμερών που χρησιμοποιείται στη γκάμα προϊόντων Oracle δεν εμφανίζεται το πρόβλημα της μη ειδικής χρώσης ενδογενούς βιοτίνης που συμβαίνει στα συστήματα ανίχνευσης στρεπταβιδίνης/βιοτίνης.

Έκφραση της HER2

Η ογκοπρωτεΐνη HER2 εκφράζεται σε επίπεδα που μπορεί να ανιχνεύσει η ανοσοϊστοχημεία στο ποσοστό έως και 20% των αδενοκαρκινωμάτων διαφόρων πρωτοπαθών εστιών. 10% έως 20% των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού είναι θετικά στην ογκοπρωτεΐνη HER2 (9). 90% των περιπτώσεων πορογενούς καρκινώματος in situ (DCIS) του φαγεσωρικού τύπου είναι θετικά (10), όπως και σχεδόν όλες οι περιπτώσεις της νόσου Paget του μαστού (11).

Σύνοψη κλινικής συμφωνίας

Το Bond Oracle HER2 IHC System σχεδιάστηκε ως μία εναλλακτική λύση στον ερευνητικό Προσδιορισμό κλινικής δοκιμής (CTA) που χρησιμοποιείται στις κλινικές μελέτες για το Herceptin®. Η απόδοση του Bond Oracle HER2 IHC System για τον καθορισμό της υπερέκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER2 αξιολογήθηκε σε μία ανεξάρτητη μελέτη, στην οποία συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα του Bond Oracle HER2 IHC System με αυτά του Dako HercepTest σε 431 δείγματα καρκίνου του μαστού από τις Η.Π.Α. Κανένα από αυτά τα δείγματα όγκου δεν λήφθηκε από ασθενή που συμμετείχε/συμμετείχε σε κλινικές δοκιμές του Herceptin®. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν συμφωνία 92,34% σε ανάλυση 2x2 (διαστήματα αξιοπιστίας 95% από 89,42% έως 94,67%) και 86,54% σε ανάλυση 3x3 (διαστήματα αξιοπιστίας 95% από 82,95% έως 89,62%) μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών.

Αρχή της διαδικασίας

Το Bond Oracle HER2 IHC System περιέχει συστατικά που απαιτούνται για την ολοκλήρωση μίας ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας χρώσης για ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμαλδεϋδη και σκληνωμένους σε παραφίνη. Μετά την επώαση με το έτοιμο για χρήση HER2 Primary Antibody (κλώνος CB11), αυτό το σύστημα εφαρμόζει έτοιμη για χρήση τεχνολογία συμπαγούς πολυμερούς. Η ενζυματική μετατροπή του εκ των υστέρων προστεθειμένου χρωμογόνου οδηγεί σε σχηματισμό εμφανούς προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Οι τομές ιστού μπορούν κατόπιν να αντιχρωθούν, να αφυδατωθούν, να διαυγαστούν και να προσκολληθούν. Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με μικροσκοπία φωτός. Για την επικύρωση των εκτελέσεων χρώσης παρέχονται αντικειμενοφόροι πλάκες μάρτυρα με τέσσερις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, μονιμοποιημένες σε φορμαλδεϋδη και σκληνωμένες σε παραφίνη. Οι τέσσερις κυτταρικές σειρές επιδεικνύουν έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER2 στις εντάσεις 0, 1+, 2+ και 3+. Η ένταση χρώσης αυτών των κυτταρικών σειρών σχετίζεται τόσο με το φορτίο υποδοχέα της ογκοπρωτεΐνης HER2 ανά κύτταρο όσο και με την κατάσταση ενίσχυσης του γονιδίου της HER2.

Το Bond Oracle HER2 IHC System (κωδικός προϊόντος TA9145) προορίζεται για χρήση στο πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης Leica Biosystems' BOND.

Παρεχόμενα συστατικά

Τα υλικά που αναφέρονται παρακάτω (πίνακας 1) επαρκούν για τη χρώση 150 αντικειμενοφόρων πλακών (60 αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης επωασμένες με HER2 Primary Antibody, 60 αντίστοιχες αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης επωασμένες με HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides επωασμένες με HER2 Primary Antibody και 15 ιστοί-θετικοί μάρτυρες του εργαστηρίου επωασμένοι με HER2 Primary Antibody). Ο αριθμός των εξετάσεων βασίζεται στη χρήση αυτοματοποιημένης διανομής 150 μL ανά αντικειμενοφόρο πλάκα. Το kit παρέχει υλικά που επαρκούν για μέγιστο αριθμό 15 ξεχωριστών εκτελέσεων χρώσης στο BOND.

HER2 Control Slides, (x15)	Τομές ανθρώπινων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, μονιμοποιημένων με φορμαλδεϋδη και σκληνωμένων σε παραφίνη που εμφανίζουν έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER2 σε εντάσεις χρώσης 0, 1+, 2+ και 3+ σε περίπτωση χρώσης με τήρηση του παρεχόμενου πρωτοκόλλου. Αυτές οι τομές είναι πλήρως προσκολλημένες και δεν απαιτούν περαιτέρω θέρμανση.
HER2 Primary Antibody, 13,5 mL	Περιέχει έτοιμο για χρήση, κεκαθαρισμένο συγγένειας, κλώνο CB11 του μονοκλωνικού IgG αντισώματος ποντικού και 0,035% 2-μεθυλισοθειαζολ-3(2H)-όνη.
HER2 Negative Control, 9 mL	Περιέχει έτοιμο για χρήση IgG ποντικού σε ισότιμη συγκέντρωση προς το HER2 Primary Antibody και 0,035% 2-μεθυλισοθειαζολ-3(2H)-όνη.
Peroxide Block, 22,5 mL	Περιέχει 3-4% υπεροξειδάσης υδρογόνου.
Post Primary, 22,5 mL	IgG αντι-ποντικού από κουνέλι (<10 μg/mL) σε ρυθμισμένο με Tris αλατούχο διάλυμα που περιέχει 10% (v/v) ζωικό ορό και 0,01% 2-μεθυλισοθειαζολ-3(2H)-όνη.
Polymer, 22,5 mL	IgG αντι-κουνελίου Poly-HRP από κατσικά (<25 μg/mL) σε ρυθμισμένο με Tris αλατούχο διάλυμα που περιέχει 10% (v/v) ζωικό ορό και 0,01% 2-μεθυλισοθειαζολ-3(2H)-όνη.
DAB Part 1 2,25 mL	Περιέχει 66 mM 3,3'-τετραϋδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης, σε διάλυμα σταθεροποιητή.
DAB Part B (x2), 22,5 mL	Περιέχει ≤0.1% (v/v) υπεροξειδάσης υδρογόνου.
Hematoxylin, 22,5 mL	Περιέχει <0.1% αιματοξυλίνη.

Πίνακας 1. Συστατικά του Bond Oracle HER2 IHC System

Οδηγίες χρήσης

Όλα τα παρεχόμενα αντιδραστήρια έχουν παρασκευαστεί ειδικά για χρήση με αυτόν τον προσδιορισμό και οι αριθμοί παρτίδας είναι ειδικοί για κάθε Bond Oracle HER2 IHC System. Για να είναι έγκυρος ο προσδιορισμός, δεν επιτρέπονται τα υποκατάστατα.

Φύλαξη και σταθερότητα

Να φυλάσσεται στους 2–8 °C. Να μην καταψύχεται. Να επιστρέφεται στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτές τις συνθήκες θα καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό. Βεβαιωθείτε πως δεν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του Bond Oracle HER2 IHC System. Τα σημεία που υποδεικνύουν επιμόλυνση και/ή αστάθεια του Bond Oracle HER2 IHC System είναι τα εξής: θολότητα των διαλυμάτων, δημιουργία οσμής και παρουσία ζήματος. Τυχόν διαφορετικές συνθήκες φύλαξης από αυτές που καθορίζονται παραπάνω θα πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη.

Προετοιμασία ιστοτεμαχίου

Όλα τα ιστοτεμάχια θα πρέπει να προετοιμάζονται για τη διατήρηση του ιστού κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τυπικές μέθοδοι επεξεργασίας ιστού για όλα τα ιστοτεμάχια (12).

Συνιστάται η προετοιμασία των ιστών σε μονιμοποιητικά με βάση τη φορμαλδεΐδη, η τυπική επεξεργασία τους και η σκλήρωσή τους σε παραφίνη. Για παράδειγμα, τα ιστοτεμάχια εκτομής θα πρέπει να σχηματίζουν ένα μπλοκ πάχους 3–4 mm και να μονιμοποιούνται για 18–24 ώρες σε φορμαλδεΐδη 10%. σε ουδέτερο ρυθμισμένο διάλυμα φορμαλδεΐδης. Οι ιστοί θα πρέπει κατόπιν να αφυδατώνονται σε σειρές αλκοόλης και να διαυγαίνονται σε ξυλένιο. Κατόπιν πρέπει να εγκλείονται σε ρευστή παραφίνη, σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 60 °C. Το πάχος τομής των ιστοτεμαχίων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3–5 μm.

Ταυτόχρονα θα πρέπει να προετοιμάζονται οι αντικειμενοφόροι πλάκες που απαιτούνται για την αξιολόγηση της ογκοπρωτεΐνης HER2 και την επιβεβαίωση του όγκου. Για τη διατήρηση της αντιγονικότητας, οι τομές ιστού που έχουν προσκολληθεί σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Leica BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 ή Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040) θα πρέπει να υποβάλλονται σε χρώση σε διάστημα 4–6 εβδομάδων από τη λήψη τομών, εάν διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (18–24 °C). Μετά τη λήψη τομών, συνιστάται η επώαση των αντικειμενοφόρων πλακών για 12–18 ώρες (κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους 37 °C. Οι τομές που απαιτούν πρόσθετη προσκόλληση μπορούν να επωαστούν στους 60 °C για ακόμη μία ώρα.

Στις Η.Π.Α., η Πράξη για τη βελτίωση των κλινικών εργαστηρίων (Clinical Laboratory Improvement Act) του 1988 απαιτεί στο άρθρο 42 CFR 493.1259(b) πως "Το εργαστήριο πρέπει να διατηρεί χρωσμένες αντικειμενοφόρους πλάκες για τουλάχιστον δέκα έτη από την ημερομηνία της εξέτασης και να φυλάσσει μπλοκ ιστοτεμαχίων για τουλάχιστον δύο έτη από την ημερομηνία της εξέτασης".

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Μόνο για επαγγελματική χρήση.

Ένα ή περισσότερα συστατικά του προϊόντος είναι επιβλαβή.

Ως γενικός κανόνας, δεν επιτρέπεται η εργασία ατόμων ηλικίας κάτω των 18 ετών με αυτό το προϊόν. Στους χρήστες πρέπει να δοθούν προσεκτικές οδηγίες σχετικά με την ενδεδειγμένη διαδικασία εργασίας, τις επιβλαβείς ιδιότητες του προϊόντος και τις αναγκαίες οδηγίες ασφαλείας.

Στα πιθανά συμπτώματα υπερβολικής έκθεσης στο ProClim™ 950, το συντηρητικό που χρησιμοποιείται στα αντιδραστήρια Oracle, περιλαμβάνονται ερεθισμός του δέρματος και των οφθαλμών, ερεθισμός βλεννογόνων και των ανώτερων αεροφόρων οδών. Η συγκέντρωση του ProClim™ 950 σε αυτό το προϊόν δεν υπερβαίνει το 0,35%. Αυτά τα διαλύματα δεν πληρούν τα κριτήρια OSHA σχετικά με επιβλαβείς ουσίες. Το Material Safety Data Sheet (φύλλο δεδομένων ασφάλειας υλικού) είναι διαθέσιμο κατόπιν αιτήματος ή στη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com.

Ο χειρισμός των ιστοτεμαχίων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, και όλων των υλικών που εκτίθενται σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται σαν αυτά να μπορούν να μεταδώσουν λοίμωξη. Θα πρέπει να απορρίπτονται με τις ενδεδειγμένες προφυλάξεις.

Ποτέ μη διανέμετε αντιδραστήρια αναρροφώντας με το στόμα και αποφύγετε την επαφή των αντιδραστήριων και των ιστοτεμαχίων με το δέρμα και με βλεννογόνους. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα ιστοτεμάχια έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, εκπλύνετε με άφθονο νερό. Αναζητήστε ιατρική βοήθεια. Ανατρέξτε στις εθνικές/νομαρχιακές ή τοπικές διατάξεις σχετικά με την απόρριψη οποιουδήποτε δυνητικά τοξικού συστατικού.

Ελαχιστοποιήστε την μικροβιακή επιμόλυνση αντιδραστήριων. Διαφορετικά μπορεί να ενισχυθεί η μη ειδική χρώση.

Διαδικασία

A. Απαιτούμενα αντιδραστήρια που δεν παρέχονται

- BOND Dewax Solution (κωδικός προϊόντος AR9222)
- BOND Eritope Retrieval Solution 1 (κωδικός προϊόντος AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (κωδικός προϊόντος AR9590)
- Τυπικοί διαλύτες της ανοσοϊστοχημείας (π.χ. αιθανόλη, απόλυτη και διαβαθμισμένη)
- Ξυλένιο (ή υποκατάστατα ξυλενίου)
- Μέσο προσκόλλησης
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

B. Απαιτούμενος εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Leica Biosystems' BOND-MAX και BOND-III πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα (-τα) χρώσης
- BOND Universal Covertiles (κωδικός προϊόντος S21.2001, S21.4583 ή S21.4611)
- BOND Mixing Stations (κωδικός προϊόντος S21.1971)
- Κλίβανος ξήρανσης, με ικανότητα διατήρησης 60 °C
- Μικροσκόπιο φωτός (μεγέθυνση αντικειμενικού φακού 4–40x)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες (Leica BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 ή Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040)
- Καλυπτρίδες
- BOND Slide Label & Print Ribbon (κωδικός προϊόντος S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (κωδικός προϊόντος CS9100)

Γ. Μεθοδολογία

- Πριν από την εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας, οι χρήστες πρέπει να καταρτιστούν στις πλήρως αυτοματοποιημένες τεχνικές ανοσοϊστοχημείας του συστήματος BOND.
- Για κάθε τομή εξέτασης που πρόκειται να υποβληθεί σε χρώση με το HER2 Primary Antibody απαιτείται πανομοιότυπη τομή για χρώση με το HER2 Negative Control. Η τομή αρνητικού μάρτυρα επιτρέπει τη διαφοροποίηση μεταξύ ειδικής και μη ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου. Κάθε εκτέλεση χρώσης στο σύστημα BOND πρέπει να περιλαμβάνει ένα HER2 Control Slide. Κατά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου χρώσης, εάν οι κυτταρικές σειρές δεν επιδεικνύουν τα σωστά πρότυπα χρώσης (ανατρέξτε στο Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), η εκτέλεση θα πρέπει να θεωρηθεί άκυρη.

Δ. Διαμόρφωση αντικειμενοφόρων πλακών

Για κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα καινούργιο BOND Universal Covertile (κωδικός προϊόντος S21.2001, S21.4583 ή S21.4611). Η χρήση των BOND Universal Covertiles τα οποία έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε ανοσοϊστοχημική χρώση ή χρώση in situ υβριδισμού, δεν έχει επικυρωθεί για αυτήν την εξέταση.

Η διαμόρφωση του δίσκου αντικειμενοφόρων πλακών (Πίνακας 2) παρέχει τη δυνατότητα ιδανικής απόδοσης του Bond Oracle HER2 IHC System Μπορούν να εκτελεστούν έως και 60 εξετάσεις.

Θέση αντικειμενοφόρου πλάκας	Περιγραφή αντικειμενοφόρου πλάκας	Αντιδραστήριο	Τύπος ιστού	Εικονίδιο αντικειμενοφόρου πλάκας
1	Περιστατικό 1	*HER2 Negative Control	Εξέταση	
2	Περιστατικό 2	*HER2 Negative Control	Εξέταση	
3	Περιστατικό 3	*HER2 Negative Control	Εξέταση	
4	Περιστατικό 4	*HER2 Negative Control	Εξέταση	
5	Περιστατικό 1	*HER2 Primary Antibody	Εξέταση	
6	Περιστατικό 2	*HER2 Primary Antibody	Εξέταση	
7	Περιστατικό 3	*HER2 Primary Antibody	Εξέταση	
8	Περιστατικό 4	*HER2 Primary Antibody	Εξέταση	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Θετικό	
10	Ιστός μάρτυρα του εργαστηρίου	*HER2 Primary Antibody	Θετικό	

Πίνακας 2. Διαμόρφωση δίσκου αντικειμενοφόρων πλακών, με επισήμανση του τύπου ιστού και του αντιδραστήριου

Ε. Βήματα της διαδικασίας

Ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα για να προετοιμάσετε ένα δίσκο αντικειμενοφόρων πλακών με την διαμόρφωση του Πίνακα 2. Αυτές οι οδηγίες θα πρέπει να διαβαστούν μαζί με το BOND System User Manual.

1. Στο όργανο BOND, βεβαιωθείτε πως οι περιέκτες ασυσκευάστων προϊόντων και μολυσματικών αποβλήτων διαθέτουν επαρκή χώρο για την εκτέλεση των απαιτούμενων εκτελέσεων χρώσης.
2. Βεβαιωθείτε πως υπάρχει αρκετή αλκοόλη, απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, BOND Dewax Solution (παρέχεται έτοιμο για χρήση), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (παρέχεται έτοιμο για χρήση) και BOND Wash Solution (παρέχεται ως συμπύκνωμα x10) στους περιέκτες ασυσκευάστων αντιδραστηρίων για τη διενέργεια των εκτελέσεων χρώσης.
3. Βεβαιωθείτε πως έχει εγκατασταθεί ένα καθαρό BOND Mixing Station.
4. Ενεργοποιήστε το πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND.
5. Ενεργοποιήστε τον BOND διαχειριστής που συνοδεύει το πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND.
6. Ανοίξτε το λογισμικό BOND.

7. Για ένα καινούργιο Bond Oracle HER2 IHC System, σαρώστε τους γραμμωτούς κώδικες των αντιδραστηρίων με το σαρωτή χειρός για να εισάγετε το σύστημα στον κατάλογο αντιδραστηρίων BOND.
8. Ανοίξτε την οθόνη ρύθμισης παραμέτρων Αντικειμενοφόρων πλακών και κάντε κλικ στο **Add case**.
9. Καταχωρίστε τις λεπτομέρειες για το πρώτο περιστατικό. Βεβαιωθείτε πως ο όγκος διανομής έχει ρυθμιστεί στα **150 µL** και πως ως πρωτόκολλο προετοιμασίας έχει επιλεγεί το πρωτόκολλο ***Dewax**. Κάντε κλικ στο OK.
10. Έχοντας επισημάνει το περιστατικό στην οθόνη Ρύθμισης παραμέτρων αντικειμενοφόρων πλακών, κάντε κλικ στο **Add slide**.
11. Καταρχήν, προσθέστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες εξέτασης της ασθενούς. Βεβαιωθείτε πως ως τύπος ιστού έχει επιλεγεί **Test tissue**.
12. Βεβαιωθείτε πως ως όγκος διανομής έχουν επιλεγεί τα **150 µL** και πως το πρωτόκολλο προετοιμασίας είναι το ***Dewax**.
13. Επιλέξτε τις τιμές λειτουργίας χρώσης **Single** και **Oracle** (μην κάνετε κλικ στο **Oracle control**).
14. Επιλέξτε επεξεργασία **IHC**.
15. Επιλέξτε ***HER2 Negative Control** από τη λίστα δεικτών. Η καρτέλα Πρωτοκόλλων προεπιλέγει το σωστό πρωτόκολλο χρώσης (***IHC Protocol H**) και το πρωτόκολλο HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Κάντε κλικ στο **Add slide**. Έχει δημιουργηθεί η αντικειμενοφόρος πλάκα αντιδραστηρίων αρνητικού μάρτυρα.
17. Ενώ βρίσκεστε ακόμη στο πλαίσιο διαλόγου προσθήκης αντικειμενοφόρου πλάκας (Add slide), επιλέξτε ***HER2 Primary Antibody** από τη λίστα δεικτών. Τα προεπιλεγμένα πρωτόκολλα και όλες οι υπόλοιπες ρυθμίσεις δεν μεταβάλλονται.
18. Κάντε κλικ στο **Add slide**. Έχει δημιουργηθεί η αντικειμενοφόρος πλάκα εξέτασης.
19. Επαναλάβετε τα βήματα 8 έως 18 ώσπου να δημιουργηθούν όλα τα περιστατικά και οι αντικειμενοφόροι πλάκες εξέτασης των ασθενών.
20. Κατόπιν, δημιουργήστε το HER2 Control Slide. Προσθέστε το στο τελευταίο περιστατικό ή δημιουργήστε ένα νέο περιστατικό για αντικειμενοφόρους πλάκες μάρτυρα, ανάλογα με την τυπική πρακτική του εργαστηρίου σας.
Σημαντική σημείωση: Το Bond Oracle HER2 IHC System απαιτεί την προσθήκη ενός HER2 Control Slide σε κάθε εκτέλεση (δηλ. δίσκο αντικειμενοφόρων πλακών) για την επικύρωση του προσδιορισμού.
21. Στο διάλογο προσθήκης αντικειμενοφόρου (Add slide), επιλέξτε ως τύπο ιστού το **Positive tissue**.
22. Κάντε κλικ στο **Oracle control**.
23. Επιλέξτε τον αριθμό παρτίδας του HER2 Control Slide από τη λίστα **Lot No**. Ο αριθμός παρτίδας αναγράφεται στην περιοχή της επικέτας της αντικειμενοφόρου πλάκας.
Σημαντική σημείωση: Το HER2 Control Slide πρέπει να προέρχεται από το ίδιο Bond Oracle HER2 IHC System που θα χρησιμοποιηθεί.
24. Επιλέξτε ***HER2 Primary Antibody** από τη λίστα δεικτών. Διατηρήστε τις ρυθμίσεις όγκου διανομής, λειτουργίας χρώσης, διαδικασίας και πρωτοκόλλου.
25. Κάντε κλικ στο **Add slide** για να προσθέσετε το HER2 Control Slide.
26. Στο τέλος, προσθέστε μία αντικειμενοφόρο πλάκα ιστού θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου.

27. Αποεπιλέξτε το **Oracle control**.

28. Επιλέξτε ***HER2 Primary Antibody** από τη λίστα δεικτών. Διατηρήστε τις ρυθμίσεις όγκου διανομής, λειτουργίας χρώσης, διαδικασίας και πρωτοκόλλου. Ως τύπου ιστού παραμένει το **Positive tissue**.

29. Κάντε κλικ στο **Add slide**. Εδώ ολοκληρώνεται η δημιουργία των αντικειμενοφόρων πλακών.

30. Εκτυπώστε τις ετικέτες των αντικειμενοφόρων πλακών. Όλες οι ετικέτες αντικειμενοφόρων πλακών Oracle φέρουν την αναγραφή «OC» Η ετικέτα για το HER2 Control Slide περιλαμβάνει επίσης τον αριθμό παρτίδας του Bond Oracle HER2 IHC System.

31. Τοποθετήστε τις ετικέτες στις αντικειμενοφόρους πλάκες.

32. Ανοίξτε τα καλύμματα όλων των περιεκτών του Bond Oracle HER2 IHC System και φορτώστε το δίσκο αντιδραστηρίων στο BOND.

33. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στο δίσκο αντικειμενοφόρων πλακών, σύμφωνα με τη σειρά διαδοχής που επισημαίνεται στον Πίνακα 2 της ενότητας Δ. Εφαρμόστε νέα Covertiles.

34. Φορτώστε το δίσκο αντικειμενοφόρων πλακών στο BOND και πατήστε το πλήκτρο **Load/Unload**.

35. Βεβαιωθείτε πως οι αντικειμενοφόροι πλάκες έχουν σαρωθεί και κάντε κλικ στο πλήκτρο **Run (Play)** στην οθόνη κατάστασης συστήματος.

36. Βεβαιωθείτε πως στο πεδίο ένδειξης του δίσκου προβάλλεται η ένδειξη **Proc (OK)**, ο αριθμός παρτίδας και ο χρόνος ολοκλήρωσης.

37. Μόλις ολοκληρωθεί η εκτέλεση πατήστε το πλήκτρο **Load/Unload** και αφαιρέστε τους δίσκους αντικειμενοφόρων πλακών από το BOND.

38. Αφαιρέστε τα Covertiles και εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε απιονισμένο νερό.

39. Αφυδατώστε, διαυγάστε και προσκολλήστε τομές.

Ποιοτικός έλεγχος

Οι διαφορές στη μονιμοποίηση ιστού, την επεξεργασία και τη σκίνηση στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να οδηγήσουν σε σημαντική μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση μαρτύρων του εργαστηρίου εκτός από τα HER2 Control Slides που παρέχει η Leica Biosystems' στο Bond Oracle HER2 IHC System. Ανατρέξτε στις κατευθυντήριες οδηγίες ποιοτικού ελέγχου του College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Βλ. επίσης CLSI (παλαιότερα NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12) και Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (13). Επιπλέον, ανατρέξτε στον Πίνακα 3 που ακολουθεί, για τους ποιοτικούς ελέγχους ανοσοϊστοχημείας και τους σκοπούς τους.

Δείγμα*	Περιγραφή	Χρώση HER2 Primary Antibody	Χρώση HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	Όπως παρέχεται στο Bond Oracle HER2 IHC System.	Ελέγχει τη διαδικασία χρώσης και επισημαίνει την εγκυρότητα της απόδοσης των αντιδραστηρίων.	Ανίχνευση μη ειδικής χρώσης υποβάθρου
Ιστός θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου	Ιστός που περιέχει το αντιγόνο-στόχο. Ο ιδανικός μάρτυρας είναι ιστός ασθενούς θετικής χρώσης, για τον καθορισμό ανεπίσθητων μεταβολών στην ευαισθησία του πρωτογενούς αντι σώματος.	Ελέγχει όλα τα βήματα της ανάλυσης. Επικυρώνει την προετοιμασία ιστού και την απόδοση χρώσης του Bond Oracle HER2 IHC System.	
Συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου	Ιστοί ή κύτταρα που αναμένεται να είναι αρνητικά (μπορούν να βρίσκονται στον ιστό του ασθενούς ή σε συστατικά ιστού θετικού/αρνητικού μάρτυρα).	Ανίχνευση μη ειδικής, διασπαιρούμενης αντιδραστικότητας του αντισώματος με κύτταρα/κυτταρικά συστατικά.	

*Μονιμοποιημένο και επεξεργασμένο όπως το δείγμα ασθενούς

Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημικοί ποιοτικοί έλεγχοι και ο σκοπός τους

Οι ιστοί μάρτυρα πρέπει να είναι βιοπτικά ή χειρουργικά ιστοτεμάχια, να έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμαλδεΰδη, υποβληθεί σε επεξεργασία και σκηνωθεί το συντομότερο δυνατό, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως το δείγμα (δείγματα) ασθενούς. Ο χειρισμός των ιστοτεμαχίων θα πρέπει να γίνεται με τον ενδεδειγμένο τρόπο, ώστε να διατηρείται η αντιγονικότητα του ιστού κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση. Για όλα τα ιστοτεμάχια θα πρέπει να εφαρμόζονται τυπικές μέθοδοι επεξεργασίας ιστού (12).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Κάθε ένα από τα παρεχόμενα HER2 Control Slides περιέχει τέσσερις πυρήνες ανθρώπινων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού με βαθμολογίες έντασης χρώσης 0, 1+, 2+ και 3+, οι οποίες έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμαλδεΰδη και έχουν σκηνωθεί σε παραφίνη. Μία αντικειμενοφόρος πλάκα πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε εκτέλεση της εξέτασης (δηλ. δίσκο αντικειμενοφόρων πλακών). Η ορθή αξιολόγηση του HER2 Control Slide που παρέχεται από την Leica Biosystems' υποδεικνύει την εγκυρότητα της εξέτασης (ανατρέξτε στο Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Τα HER2 Control Slides που παρέχονται μαζί με αυτό το σύστημα επικυρώνουν μόνο την απόδοση των αντιδραστηρίων και όχι την προετοιμασία των ιστών.

Ιστός θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody

Εάν χρησιμοποιούνται συστατικά ιστού θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου, πρέπει να είναι βιοπτικά ή χειρουργικά ιστοτεμάχια, να έχουν μονιμοποιηθεί και εγκλειστεί το συντομότερο δυνατό, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως το δείγμα (δείγματα) ασθενούς. Οι ιστοί θετικού μάρτυρα καταδεικνύουν τη σωστή προετοιμασία των ιστών και την εγκυρότητα των τεχνικών χρώσης. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται τουλάχιστον ένα συστατικό θετικού μάρτυρα σε κάθε εκτέλεση της εξέτασης. Η τομή θετικού μάρτυρα πρέπει να χαρακτηρίζεται από

ασθενώς θετική χρώση, για να μπορεί να επισημαίνει ανεπαίσθητες μεταβολές της ευαισθησίας του κύριου αντισώματος.

Σημείωση: Τα συστατικά ιστού θετικού μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για την παρακολούθηση της ορθής απόδοσης επεξεργασμένων ιστών μαζί με τα αντιδραστήρια της εξέτασης και OX1 ως βοήθημα για την διατύπωση συγκεκριμένων ερμηνειών για τα δείγματα των ασθενών. Εάν ο ιστός θετικού μάρτυρα δεν επιδειξει την ενδεδειγμένη θετική χρώση, τα αποτελέσματα των ιστοτεμαχίων ασθενών θα πρέπει να θεωρηθούν άκυρα.

Κατάλληλο επίσης ως υλικό μάρτυρα του εργαστηρίου μπορεί να είναι επίσης ένα μπλοκ μάρτυρα πολλαπλών ιστών που περιέχει καρκινικούς ιστούς, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν και τους 4 βαθμούς HER2.

Συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody

Εάν χρησιμοποιούνται συστατικά αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου, θα πρέπει να είναι φρέσκα βιοπτικά ή χειρουργικά ιστοτεμάχια, μονιμοποιημένα, επεξεργασμένα και σκληνωμένα το συντομότερο δυνατό, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως το δείγμα (δείγματα) ασθενών. Η χρήση ιστού μάρτυρα, που αποδεδειγμένα είναι αρνητικός στην ογκοπρωτεΐνη HER2 μαζί με κάθε χρώση, επικυρώνει την ειδικότητα του πρωτογενούς αντισώματος και παρέχει μία ένδειξη για μη ειδική χρώση υποβάθρου. Η ποικιλία των διαφόρων κυτταρικών τύπων που ανευρίσκονται στις περισσότερες ιστικές τομές, παρέχει εσωτερικές θέσεις αρνητικού μάρτυρα (θα πρέπει να επικυρωθούν από το χρήστη). Φυσιολογικοί πόροι του μαζικού αδένου που δεν έχουν προσβληθεί από τον όγκο, μπορούν να λειτουργήσουν ως αναφορά για την εγκυρότητα του προσδιορισμού. Εάν συμβεί ειδική χρώση στον εσωτερικό ιστό αρνητικού μάρτυρα, τα αποτελέσματα των δειγμάτων ασθενών θα πρέπει να θεωρηθούν άκυρα.

Κατάλληλο ως ιστός αρνητικού και θετικού μάρτυρα μπορεί να είναι επίσης ένα μπλοκ μάρτυρα πολλαπλών ιστών που αντιπροσωπεύει και τους 4 βαθμούς HER2.

Ιστός ασθενούς – HER2 Negative Control

Χρησιμοποιήστε το παρεχόμενο HER2 Negative Control αντί του HER2 Primary Antibody σε μία αντίστοιχη τομή κάθε ασθενούς, για την αξιολόγηση της μη ειδικής χρώσης και την ακριβή ερμηνεία της ειδικής χρώσης ογκοπρωτεΐνης HER2 στη θέση του αντιγόνου.

Ιστός ασθενούς – HER2 Primary Antibody

Η ένταση της θετικής χρώσης πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο οποιασδήποτε μη ειδικής χρώσης υποβάθρου με το HER2 Negative Control. Όπως συμβαίνει και σε κάθε ανοσοϊστοχημική δοκιμασία, η λήψη αρνητικού αποτελέσματος σημαίνει πως το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε και όχι πως το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στο ιστό που υποβλήθηκε στον προσδιορισμό. Ανατρέξτε στις ενότητες **Τεκμηρίωση της ακολουθούμενης σειράς ελέγχου των αντικειμενοφόρων πλακών, Αξιολόγηση απόδοσης και Ανοσοαντιδραστικότητα** για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την ανοσοαντιδραστικότητα του Bond Oracle HER2 IHC System.

Επικύρωση του προσδιορισμού

Πριν από την πρώτη χρήση οποιουδήποτε συστήματος αντισωμάτων ή χρώσης σε διαγνωστικές διαδικασίες, ο χρήστης θα πρέπει να επικυρώσει την ειδικότητα του αντισώματος, ελέγχοντάς το σε μία σειρά ιστών του εργαστηρίου με γνωστά θετικά και αρνητικά ανοσοϊστοχημικά προφίλ. Ανατρέξτε στην ενότητα **Ποιοτικός έλεγχος** και στις απαιτήσεις ποιοτικού ελέγχου του CAP Certification Program for Immunohistochemistry και/ή CLSI (παισιότερα NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12). Αυτές οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να επαναλαμβάνονται με κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων ή οπότε μεταβάλλονται οι παράμετροι του προσδιορισμού. Για την επικύρωση του προσδιορισμού ενδείκνυται ανθρωπίνος ιστός διηθητικού πορογενούς καρκινώματος του μαστού με γνωστές εντάσεις χρώσης της ογκοπρωτεΐνης HER2 από 0 έως 3+ καθώς και άλλοι ενδεδειγμένοι αρνητικοί ιστοί.

Ερμηνεία της χρώσης

Για τον καθορισμό της έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER2 θα πρέπει να αξιολογείται μόνο το πρότυπο χρώσης και η ένταση χρώσης της μεμβράνης με χρήση της κλίμακας που παρατίθεται στον Πίνακα 4. Η

αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών θα πρέπει να γίνεται από ιατρό Παθολογοανατόμο με χρήση μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου. Για την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και βαθμολογίας, ενδείκνυται αντικειμενικός φακός μεγέθυνσης 10x. Για την επιβεβαίωση της βαθμολογίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται αντικειμενικός φακός μεγέθυνσης 20–40x. Η κυτταροπλασματική χρώση θα πρέπει να θεωρείται μη ειδική χρώση και δεν θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην αξιολόγηση της έντασης χρώσης της μεμβράνης (14). Για βοήθεια σχετικά με τη διαφοροποίηση μεταξύ των βαθμολογιών χρώσης 0, 1+, 2+ και 3+, ανατρέξτε στο Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide για χαρακτηριστικές εικόνες των εντάσεων χρώσης. Θα πρέπει να βαθμολογούνται μόνο δείγματα από ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του μαστού. Στις περιπτώσεις ταυτόχρονου *in situ* καρκινώματος και διηθητικού καρκινώματος στο ίδιο δείγμα, θα πρέπει να βαθμολογείται μόνο το διηθητικό μέρος.

Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής χρώσης	Βαθμολογία	Αξιολόγηση
Δεν παρατηρείται χρώση ή η χρώση μεμβράνης παρατηρείται σε λιγότερα από 10% των καρκινικών κυττάρων.	0	Αρνητική
Ασθενέστατη/μόλις ορατή χρώση μεμβράνης ανιχνεύεται σε περισσότερα από 10% των καρκινικών κυττάρων. Η χρώση των κυττάρων αφορά μόνο τμήματα των μεμβρανών τους.	1+	Αρνητική
Ασθενής έως μέτρια χρώση ολόκληρης της μεμβράνης παρατηρείται σε περισσότερα από 10% των καρκινικών κυττάρων.	2+	Υποπτη (ασθενώς θετική)
Ισχυρή χρώση ολόκληρης της μεμβράνης παρατηρείται σε περισσότερα από 10% των καρκινικών κυττάρων.	3+	Ισχυρώς θετική

Πίνακας 4. Εμφάνιση της χρώσης HER2

Τα αποτελέσματα χρώσης του Bond Oracle HER2 IHC System ερμηνεύονται ως αρνητικά για την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER2 στις βαθμολογίες έντασης χρώσης 0 και 1+, ύποπτα (ασθενώς θετικά) σε βαθμολογία χρώσης 2+ και ισχυρώς θετικά σε βαθμολογία έντασης χρώσης 3+. Το Bond Oracle HER2 IHC System δεν προορίζεται για την παροχή προγνωστικών πληροφοριών για την ασθενή και/ή τον ιατρό και δεν έχει επικυρωθεί για αυτό το σκοπό. Για κάθε αξιολόγηση χρώσης, οι αντικειμενοφόροι πλάκες θα πρέπει να εξετάζονται με τη σειρά που αναφέρεται παρακάτω για την αξιολόγηση της εγκυρότητας της εκτέλεσης χρώσης και για την ημι-ποσοτική αξιολόγηση της έντασης χρώσης του δείγματος ιστού.

Τεκμηρίωση της ακολουθούμενης σειράς ελέγχου των αντικειμενοφόρων πλακών

Οι αντικειμενοφόροι πλάκες θα πρέπει να ελέγχονται με την ακόλουθη σειρά:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Ένας έγκυρος προσδιορισμός με το Oracle HER2 Control Slide επιδεικνύει τα εξής:

- Παρουσία ισχυρής καφεοειδούς χρώσης ολόκληρης της κυτταρικής μεμβράνης στην κυτταρική σειρά μάρτυρα 3+, SK-BR-3.
- Παρουσία ασθενούς έως μέτριας καφεοειδούς χρώσης ολόκληρης της κυτταρικής μεμβράνης στην κυτταρική σειρά μάρτυρα 2+, MDA-MB-453.
- Παρουσία ασθενέστατης/μόλις ορατής καφεοειδούς χρώσης τμημάτων της κυτταρικής μεμβράνης στην κυτταρική σειρά μάρτυρα 1+, MDA-MB-175.
- Απουσία χρώσης στην κυτταρική σειρά μάρτυρα 0, MDA-MB-231.

Σημαντική σημείωση: Ένα χαρακτηριστικό της κυτταρικής σειράς μάρτυρα 1+ MDA-MB-175 είναι το χαρακτηριστικό μοντέλο ανάπτυξης, στο οποίο τα κύτταρα σχηματίζουν αθροίσεις. Αυτές οι αθροίσεις δημιουργούν μία συνεχή, φωτεινή περιοχή ψηκροειδούς παρυφής σε όλη την κυτταρική άθροιση. Η χρώση αυτής της ψηκροειδούς παρυφής θα είναι ισχυρότερη από την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη.

Το σωστό πρότυπο χρώσης 1+ της ογκοπρωτεΐνης HER2 είναι η ασθενέστατη/μόλις ορατή, τμηματική χρώση της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αυτήν την κυτταρική σειρά μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σπικτή ανοσοχρώση της περιοχής Golgi στο κυτταρόπλασμα.

2. Ιστός θετικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Primary Antibody

Θα πρέπει να παρατηρηθεί ΠΑΡΟΥΣΙΑ καφεοειδούς χρώσης της μεμβράνης, σύμφωνα με την γνωστή κατάσταση της ογκοπρωτεΐνης HER2 στον επιλεγμένο θετικό μάρτυρα.

3. Συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα του εργαστηρίου – HER2 Positive Control

Θα πρέπει να παρατηρηθεί ΑΠΟΥΣΙΑ χρώσης της μεμβράνης. Ένα συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα επιβεβαιώνει την απουσία ανίχνευσης διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του συστήματος σε ειδικά στοχοποιημένα κύτταρα/κυτταρικά συστατικά. Εάν συμβεί ειδική χρώση σε συστατικό ιστού αρνητικού μάρτυρα, τα αποτελέσματα των δειγμάτων ασθενών θα πρέπει να θεωρηθούν άκυρα.

4. Ιστός ασθενούς – χρωσμένος με HER2 Negative Control

Η ΑΠΟΥΣΙΑ χρώσης της μεμβράνης επιβεβαιώνει την ειδική σήμανση του αντιγόνου-στόχου από το πρωτεΐον αντίσωμα. Άλλες καφεοειδείς χρώσεις του κυτταροπλάσματος του δείγματος που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με το HER2 Negative Control, όπως συνδεδετικός ιστός, λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα ή νεκρωτικός ιστός θα πρέπει να θεωρηθούν μη ειδικές χρώσεις υποβάθρου και θα πρέπει να καταγράφονται.

5. Ιστός ασθενούς – χρωσμένος με το HER2 Primary Antibody

Τα επίπεδα έκφρασης της ογκοπρωτεΐνης HER2 καθορίζονται από τα κριτήρια που αναφέρονται στον Πίνακα 4 και στο Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

Περιορισμοί

A. Γενικοί περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία εργαστηριακή τεχνική πολλαπλών βημάτων που προορίζεται για την υποστήριξη της ερμηνείας και του καθορισμού ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών. Πρόκειται για μία τεχνική που προϋποθέτει ειδική εκπαίδευση σε όλες τις πτυχές της διαδικασίας (συμπεριλαμβανομένης της επιλογής των κατάλληλων αντιδραστηρίων, ιστού, μονιμοποίησης, επεξεργασίας και προετοιμασίας της αντικειμενοφόρου πλάκας για ανοσοϊστοχημεία) και της ερμηνείας.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση ιστού εξαρτάται από το χειρισμό, τη μονιμοποίηση και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, ξήρανση, θέρμανση, κοπή ή η επιμόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να επιφέρει τεχνικά σφάλματα, παγίδευση αντισωμάτων ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε διακυμάνσεις της μονιμοποίησης, των μεθόδων σκλήνωσης ή σε εγγενείς ανωμαλίες του ίδιου του ιστού (15). Η υπερβολική ή η ανεπαρκής αντίχρωση μπορεί επίσης να επιφέρει έκπτωση της ορθής ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

Η μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, χαρακτηρίζεται από διάχυτη εμφάνιση. Σε τομές ιστού που μονιμοποιήθηκαν υπερβολικά σε φορμαλδεΐδη μπορεί επίσης να εμφανιστεί σποραδική χρώση συνδεδεικού ιστού. Χρησιμοποιείτε ακέραια κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης. Η χρώση νεκρωτικών ή εκφυλισμένων κυτάρων αποτελεί συχνά μη ειδική χρώση (16). Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορούν να παρατηρηθούν λόγω μη-ανοσολογικής πρόσδεσης πρωτεϊνών ή προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Μπορούν επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα όπως η ψευδοϋπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα) ή η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C), ανάλογα με τον τύπο της χρησιμοποιούμενης ανοσοϊστοχημικής χρώσης.

Οι ιστοί ασθενών που έχουν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας Β και περιέχουν το επιφανειακό αντιγόνο του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg) ενδέχεται να παρουσιάσουν μη ειδική χρώση με την υπεροξειδάση της ραπανιδάς (17).

Η μη αναμενόμενη ανοσοϊστοχημική χρώση και οι διακυμάνσεις της χρώσης ενδέχεται να οφείλονται σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης του κωδικοποιητικών γονιδίων ή των αντιγόνων. Οποιοδήποτε μεταβολή των αναμενόμενων προτύπων χρώσης θα πρέπει να ερμηνεύεται μαζί με όλες τις υπόλοιπες διαγνωστικές εξετάσεις.

Η ερμηνεία της ανοσοϊστοχημικής χρώσης θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες και τη χρήση κατάλληλου υλικού μάρτυρα. Θα πρέπει δε να αξιολογείται στο πλαίσιο του αναμνηστικού του ασθενούς και οποιωνδήποτε άλλων διαγνωστικών εξετάσεων, από έμπειρο ιατρό Παθολογοανατόμο.

Η απόδοση του προσδιορισμού (δηλ. οι αξιολογήσεις επάρκειας τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών μαρτύρων) και η ερμηνεία οποιασδήποτε ανοσοϊστοχημικής χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να εκτελούνται σε εγκεκριμένο/αδειοδοτημένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη ιατρού Παθολογοανατόμου με την κατάλληλη κατάρτιση και την πρόσπουσα εμπειρία, ο οποίος φέρει και την ευθύνη για τη συνολική αξιολόγηση του ανοσοϊστοχημικού προσδιορισμού και της ερμηνείας του.

B. Ειδικοί για το προϊόν περιορισμοί

Αυτό το προϊόν δεν προορίζεται για χρήση σε κυτταρομετρία ροής. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης δεν έχουν καθοριστεί για την κυτταρομετρία ροής.

Ως αποτέλεσμα αποδόμησης των αντιγόνων σε αυτήν την τομή ιστού ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες που απαιτούνται για την αξιολόγηση της ογκοπρωτεΐνης HER2 και για την επιβεβαίωση του όγκου, θα πρέπει να προετοιμάζονται ταυτόχρονα. Για τη διατήρηση της αντιγονικότητας, οι τομές ιστού που έχουν προσκολληθεί σε αντικειμενοφόρους (Leica BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 ή Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040) θα πρέπει να υποβάλλονται σε χρώση σε διάστημα 4–6 εβδομάδων από τη λήψη των τομών, εάν διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (18–24 °C). Μετά τη λήψη των τομών, συνιστάται η επώαση των αντικειμενοφόρων πλακών για 12–18 ώρες στους 37 °C. Οι τομές που απαιτούν περαιτέρω προσκόλληση μπορούν να επωαστούν στους 60 °C για ακόμη μία ώρα.

Μεταξύ των παρτίδων ανάπτυξης κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται στο Bond Oracle HER2 IHC System, ενδέχεται να παρατηρηθούν ελάχιστες φυσικές διακυμάνσεις των ανοσοϊστοχημικών προφίλ. Αυτή η φυσική διακύμανση βρίσκεται εντός αποδεκτών επιπέδων ανοχής μίας βιολογικής οντότητας και δεν επηρεάζει την ερμηνεία ή την απόδοση του συστήματος.

Ο χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών τόσο με κυτταρομετρία ροής όσο και με in situ υβριδισμό, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, υπόκειται επίσης σε φυσικές βιολογικές διακυμάνσεις. Αναφέρονται επίσης οι τεχνικές διακυμάνσεις και οι διακυμάνσεις ερμηνείας των κυτταρικών σειρών μάρτυρα, όπως αξιολογούνται από in situ υβριδισμό φθορισμού (18).

Για την αξιολόγηση των HER2 Control Slides θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι σχετικές ημερομηνίες λήξης. Φυλάσσετε το Bond Oracle HER2 IHC System σε θερμοκρασία 2–8 °C. Να μην καταψύχεται. Να επιστρέφεται στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτές τις συνθήκες θα καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό.

Μην αντικαθιστάτε τα αντιδραστήρια Bond Oracle HER2 IHC System με οποιαδήποτε άλλα συστατικά τα οποία παρέχονται είτε από τη Leica Biosystems είτε από άλλους κατασκευαστές. Η ενέργεια αυτή θα καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό.

Η διενέργεια όλων των βημάτων που περιγράφονται στις ενότητες Γ έως Ε (Διαδικασία) με την προκαθορισμένη σειρά, είναι ουσιώδους σημασίας. Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτήν τη σειρά θα καταστήσει τον προσδιορισμό άκυρο.

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ιστοί που έχουν μονιμοποιηθεί μόνο σε μονιμοποιητικά με βάση τη φορμαλδεΰδη. Η χρήση οποιουδήποτε άλλου τύπου μονιμοποιητικού θα καταστήσει τον προσδιορισμό άκυρο.

Δεν έχουν επικυρωθεί οι τομές ιστού που δεν έχουν κοπεί στο συνιστώμενο εύρος πάχους τομής. Η χρήση οποιουδήποτε άλλου πάχους τομής μπορεί να καταστήσει άκυρο τον προσδιορισμό.

Δεδομένα κυτταρικών σειρών

Κυτταρική σειρά	Προφίλ Bond Oracle HER2 IHC System	HER2 Φορτίο υποδοχέα ανά κύτταρο*	Κατάσταση ενίσχυσης του γονιδίου HER2 ⁺	
			Αριθμός αντιγράφων HER2	Αναλογία γονιδίου HER2:Chr17
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

*Ανάλυση φορτίου υποδοχέα HER2 όπως αξιολογήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. * Κατάσταση ενίσχυσης γονιδίου HER2 όπως αξιολογήθηκε με ανάλυση FISH διπλού ανιχνευτή (HER2:χρωμόσωμα 17).

Πίνακας 5. Προφίλ HER2 Control Slide

Κλινική συμφωνία των Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest

Στο Μέρος 1 της μελέτης εξετάστηκε η καταλληλότητα του Bond Oracle HER2 IHC System για χρήση ως βοήθημα επιλογής της θεραπείας με Herceptin® (trastuzumab). Η μελέτη σχεδιάστηκε για να εξετάσει τη συμφωνία μεταξύ του Bond Oracle HER2 IHC System και του Dako HercepTest, το οποίο θεωρείται και το «χρυσό πρότυπο» για αυτόν τον προσδιορισμό. Το κριτήριο αποδοχής καθορίστηκε ως υψηλότερο από το 75% της συνολικής συμφωνίας μεταξύ των δύο εξετάσεων με διάστημα αξιοπιστίας (ΔΑ) 95%.

Η μελέτη διενεργήθηκε ως μία τυφλή αξιολόγηση σε δύο τοποθεσίες των Η.Π.Α. Σε κάθε ερευνητική τοποθεσία χορηγήθηκαν δείγματα καρκίνου του μαστού με γνωστή κατάσταση HER2, μονιμοποιημένα σε φορμαλδεϋδη και σκληνωμένα σε παραφίνη. Τα περιστατικά επιλέχθηκαν με ανάστροφη διαδοχική σειρά από τα κλινικά αρχεία, αντιπροσωπεύοντας τη διαδοχική ροή περιστατικών σε ένα ιστοπαθολογοανατομικό εργαστήριο για κλινικές δοκιμές. Ελέγχθηκαν ανεξάρτητα από οποιουδήποτε άλλους προγνωστικούς και/ή προβλεπτικούς παράγοντες, χωρίς την εισαγωγή κανενός σφάλματος στην κοόρτη. Στις Τοποθεσίες 1 και 2 ελέγχθηκαν κοόρτες των 160 και 292 δειγμάτων αντίστοιχα. Κάθε κοόρτη είχε μία ισότιμη αντιπροσωπεία από ύποπτα/ θετικά (2+, 3+) και αρνητικά (0, 1+) περιστατικά, με βάση τις προηγουμένως αντιστοιχισμένες βαθμολογίες HER2 IHC, οδηγώντας έτσι σε συνολικό πληθυσμό μελέτης τα 452 δείγματα. Δώδεκα δείγματα (12) θεωρήθηκαν ακατάλληλα, λόγω ανεπαρκούς διηθητικού όγκου και εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Σε περαιτέρω εννέα (9) δείγματα δεν ήταν εφικτή η βαθμολόγηση, λόγω αποκόλλησης ιστού από την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας, οδηγώντας έτσι σε τελικό πληθυσμό της μελέτης τα 431 δείγματα.

Όλα τα περιστατικά υποβλήθηκαν σε χρώση με το HercepTest σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή που ορίζονται στο φυλλάδιο οδηγιών χρήσης. Οι τομές που ακολούθησαν υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System μέσα σε πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης Leica Biosystems' BOND. Όλα τα περιστατικά αποσυνδέθηκαν από τις πληροφορίες ταυτοποίησης ασθενούς και συνοδεύτηκαν από κλινικά στοιχεία σχετικά με το μέγεθος, το στάδιο, το βαθμό του όγκου και την κατάσταση υποδοχέων οιστρογόνων.

Όλες οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι πλάκες καλύφθηκαν (masked) και βαθμολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από έμπειρους γνωματεύοντες σε δύο τοποθεσίες. Για την ανάλυση συμφωνίας 2x2, οι βαθμολογίες ερμηνεύτηκαν ως αρνητικές εάν η ένταση χρώσης ήταν 0 ή 1+, και θετικές για τις βαθμολογίες χρώσης 2+ ή 3+. Για την ανάλυση συμφωνίας 3x3, οι βαθμολογίες ερμηνεύτηκαν ως αρνητικές εάν η ένταση χρώσης ήταν 0 ή 1+, ύποπτες για τις βαθμολογίες 2+ και θετικές για τις βαθμολογίες χρώσης 3+. Τα δεδομένα κατόπιν αναλύθηκαν για τη συμφωνία θετικής χρώσης και τη συμφωνία αρνητικής χρώσης.

Αποτελέσματα συμφωνίας 2x2

Σε αυτήν την κύρια ανάλυση, τα αποτελέσματα των δύο εξετάσεων (Bond Oracle HER2 IHC System και Dako HercepTest) ταξινομούνται ως αρνητικά (0,1+) ή θετικά (2+, 3+). Οι συχνότητες και των τεσσάρων πιθανών συνδυασμών προβάλλονται σε μορφή πίνακα 2x2 (βλ. Πίνακα 6). Κατόπιν υπολογίστηκε το ποσοστό συνολικής συμφωνίας βάσει αυτού του πίνακα 2x2, συνοδευόμενο από ακριβές διάστημα αξιοπιστίας 95% (με βάση τη διωνυμική κατανομή).

Σύμφωνα με τη μηδενική υπόθεση (H_0), έναντι της οποίας τίθενται τα κριτήρια επιτυχίας, η συμφωνία δεν υπερβαίνει το 75%.

Η παρατηρηθείσα συμφωνία για 431 δείγματα μεταξύ των δύο εξετάσεων σε ανάλυση 2x2 ανήλθε στο 92,34% (398/431) με ΔΑ 95% από 89,42% έως 94,67%. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης (H_0), πως η συμφωνία δεν υπερβαίνει το 75% με τιμή $p < 0,0001$.

Το ποσοστό Θετικής Συμφωνίας (ευαισθησία) ή η ικανότητα του Bond Oracle HER2 IHC System να αναγνωρίζει ορθά τα θετικά περιστατικά του HercepTest (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Bond Oracle HER2 IHC System όσο και του HercepTest που βαθμολογήθηκαν ως θετικά, από όλα τα θετικά περιστατικά του HercepTest) ανήλθε σε 84,87% (129/152) με ΔΑ 95% από 78,17% έως 90,16%. Το ποσοστό Αρνητικής Συμφωνίας (ειδικότητα) ή η ικανότητα της εξέτασης να αναγνωρίζει ορθά τα αρνητικά περιστατικά του HercepTest (το ποσοστό των δειγμάτων τόσο του Bond Oracle HER2 IHC System όσο και του HercepTest που βαθμολογήθηκαν ως αρνητικά, από όλα τα αρνητικά περιστατικά του HercepTest) ανήλθε σε 96,42% (269/279) με ΔΑ 95% από 93,51% έως 98,27%.

		HercepTest		
		Αρνητικά	Θετικά	Σύνολο
Bond Oracle HER2 IHC System	Αρνητικά	269	23	292
	Θετικά	10	129	139
	Σύνολο	279	152	431

Συμφωνία 2x2 (ΔΑ 95%) = 92,34% (89,42 έως 94,67%), $p < 0,0001$

Πίνακας 6. Συμφωνία 2x2 του Bond Oracle HER2 IHC System με το HercepTest

Αποτελέσματα συμφωνίας 3x3

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν ως αρνητικά (0 ή 1+), ύποπτα (2+) ή θετικά (3+) για την ανάλυση 3x3 και εμφάνισαν συμφωνία 86,54% (373/431) με ΔΑ 95% από 82,95% έως 89,62%. Επομένως, η μηδενική υπόθεση (H_0) πως η συμφωνία δεν υπερβαίνει το 75% απορρίφθηκε με τιμή $p < 0,0001$.

Το ποσοστό Θετικής Συμφωνίας 3+ (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Bond Oracle HER2 IHC System όσο και του HercepTest που βαθμολογήθηκαν ως 3+ θετικά από όλα τα 3+ θετικά περιστατικά του HercepTest) σε αυτήν τη μελέτη ανήλθε σε 73,33% (66/90) με ΔΑ 95% από 62,97% έως 82,11%. Το ποσοστό Αρνητικής Συμφωνίας ανήλθε σε 96,42% (269/279) με ΔΑ 95% από 93,51% έως 98,27%. Βλ. Πίνακα 7.

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

Συμφωνία 3x3 (ΔΑ 95%) = 86,54% (82,95% έως 89,62%), $p < 0,0001$

Πίνακας 7. Συμφωνία 3x3 του Bond Oracle HER2 IHC System με το HercepTest

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα που παρήχθησαν σε αυτήν τη μελέτη δείχνουν πως το Bond Oracle HER2 IHC System μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοήθημα στον καθορισμό της επιλογής θεραπείας με Herceptin® (trastuzumab), με βάση την υψηλή συμφωνία του με το HercepTest.

Κλινική συμφωνία του Bond Oracle HER2 IHC System το PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Το Μέρος 2 της μελέτης σχεδιάστηκε για να μελετήσει τη συμφωνία μεταξύ του Bond Oracle HER2 IHC System και του Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, το οποίο και θεωρείται το «χρυσό πρότυπο» για τον προσδιορισμό reflex αξιολόγησης γονιδίων όταν χρησιμοποιείται μαζί με την ανοσοϊστοχημία για την HER2.

Αυτή η μελέτη εκτελέστηκε στις ίδιες ερευνητικές τοποθεσίες και με την ίδια κούρτη μελέτης όπως και στο Μέρος 1. Όλα τα περιστατικά υποβλήθηκαν σε χρώση με το Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αυτές καθορίζονται στο φύλλο οδηγιών χρήσης. Διαδοχικές τομές από κάθε περιστατικό υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System σε πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND (από το Μέρος 1 της κλινικής μελέτης). Από τα 431 περιστατικά που υποβλήθηκαν σε χρώση, σε τρεις περιπτώσεις δεν λήφθηκε αποτέλεσμα λόγω ανεπαρκούς υβριδισμού του ανιχνευτή. Συνεπώς, ο συνολικός αριθμός της κούρτης ανήλθε σε 428 περιστατικά.

Όλες οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι πλάκες βαθμολογήθηκαν από έμπειρους γνωματεύοντες σε δύο ερευνητικές τοποθεσίες. Για την ανάλυση συμφωνίας 3x2, οι βαθμολογίες ερμηνεύτηκαν ως αρνητικές, εάν ο λόγος ενίσχυσης γονιδίου HER2/CEP17 ήταν μικρότερος (<) από 2,0 και θετικές εάν ήταν μεγαλύτερος ή ίσος (>) του 2,0 μετά από μέτρηση 20 καρκινικών κυττάρων.

Αποτελέσματα συμφωνίας 3x2

Η παρατηρηθείσα συμφωνία για 428 δείγματα μεταξύ των δύο ελέγχων σε ανάλυση 3x2 ανήλθε στο 87,6% (375/428) με ΔΑ 95% μεταξύ 84% και 90%.

Το ποσοστό Θετικής Συμφωνίας (ευαισθησία) ή η ικανότητα του Bond Oracle HER2 IHC System να αναγνωρίζει ορθά τα θετικά περιστατικά του PathVysion (το ποσοστό δειγμάτων τόσο του Bond Oracle HER2 IHC System όσο και του PathVysion που βαθμολογήθηκαν ως θετικά, από όλα τα θετικά περιστατικά του PathVysion) ανήλθε σε 93,8% (61+30/97) με ΔΑ 95% από 86,8% έως 97,4%.

Το ποσοστό Αρνητικής Συμφωνίας (ειδικότητα) ή η ικανότητα της εξέτασης να αναγνωρίζει ορθά τα αρνητικά περιστατικά του PathVysion (το ποσοστό των δειγμάτων του Bond Oracle HER2 IHC System και του PathVysion που βαθμολογήθηκαν ως αρνητικά από όλα τα αρνητικά περιστατικά του PathVysion) ήταν 85,8% (284/331) με ΔΑ 95% από 81,6% έως 89,2%. Βλ. Πίνακα 8.

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

Συνολική Συμφωνία (ΔΑ 95%) = 87,6% (84 έως 90%)

Πίνακας 8. Συμφωνία 3x2 της χρώσης Bond Oracle HER2 IHC System με το kit PathVysion HER-2 DNA Probe.

Ανοσοαντιδραστικότητα – Κατάλογος φυσιολογικών ιστών

Τύπος ιστού	Πρότυπο χρώσης	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Επινεφρίδιο	Αρνητικό	Αρνητικό
Παρεγκεφαλίδα	Αρνητικό	Αρνητικό
Εγκέφαλος	Αρνητικό	Αρνητικό
Μαστός	Αρνητικό	Αρνητικό
Μυελός των οστών	Αρνητικό	Αρνητικό
Παχύ έντερο	Αρνητικό	Αρνητικό
Οισοφάγος	Αρνητικό	Αρνητικό
Οφθαλμός	Αρνητικό	Αρνητικό
Υπόφυση	Μέτρια κυτταροπλασματική χρώση, παρατηρήθηκε σε κύτταρα υπόφυσης (1/3)	Αρνητικό
Νεφρός	Αρνητικό	Αρνητικό
Λάρυγγας	Αρνητικό	Αρνητικό
Ήπαρ	Αρνητικό	Αρνητικό
Πνεύμονας	Αρνητικό	Αρνητικό
Μεσοθήλιο	Αρνητικό	Αρνητικό
Ωοθήκη	Αρνητικό	Αρνητικό
Πάγκρεας	Αρνητικό	Αρνητικό
Παραθυρεοειδής	Αρνητικό	Αρνητικό
Περιφερικό νεύρο	Αρνητικό	Αρνητικό
Προστάτης	Αρνητικό	Αρνητικό
Σιελογόνος αδένας	Αρνητικό	Αρνητικό
Δέρμα	Αρνητικό	Αρνητικό
Λεπτό έντερο	Αρνητικό	Αρνητικό
Σπλήνας	Αρνητικό	Αρνητικό
Στόμαχος	Ασθενής κυτταροπλασματική χρώση, παρατηρήθηκε σε γαστρικούς αδένες (2/3)	Αρνητικό
Γραμμωτός μυς	Αρνητικό	Αρνητικό
Όρχις	Αρνητικό	Αρνητικό
Θύμος αδένας	Αρνητικό	Αρνητικό
Θυρεοειδής αδένας	Αρνητικό	Αρνητικό
Αμυγδαλή (φάρυγγα)	Αρνητικό	Αρνητικό
Τράχηλος μήτρας	Αρνητικό	Αρνητικό
Μήτρα	Αρνητικό	Αρνητικό

Πίνακας 9. Κατάλογος χρώσης φυσιολογικών ιστών

Μελέτη αναπαραγωγιμότητας

Έλεγχος ακριβείας εντός εκτέλεσης και μεταξύ εκτελέσεων

Ο έλεγχος ακριβείας διενεργήθηκε στις εγκαταστάσεις της Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικροδιάταξη πολλαπλών ιστών (TMA) μονιμοποιημένη σε φορμαλδεΐδη και σκηνωμένης σε παραφίνη από την Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), και αποτελείται από 20 ιστικούς πυρήνες διαμέτρου 4 mm, διηθητικού καρκίνου του μαστού. Τα 20 περιστατικά επιλέχθηκαν με βάση τις προηγουμένως αντιστοιχισμένες βαθμολογίες HER2. Σε αυτή τη βάση, συμπεριλήφθηκαν 5 περιστατικά HER2 3+, 5 περιστατικά HER2 2+, 5 περιστατικά HER2 1+ και 5 περιστατικά της HER2 0.

A. Έλεγχος ακριβείας εντός της εκτέλεσης

Ο έλεγχος ακριβείας εντός της εκτέλεσης των Bond Oracle HER2 IHC System αξιολογήθηκε σε 40 διαδοχικές τομές από μία TMA αποτελούμενη από 20 διηθητικούς καρκίνους μαστού και 40 HER2 Control Slides. Όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System στο πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND. Οι τομές υποβλήθηκαν σε χρώση κατά τη διάρκεια μίας συνεχούς περιόδου με χρήση ενός Bond Oracle HER2 IHC System από την ίδια κατασκευαστική παρτίδα. Οι χρωσμένες τομές τυφλοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από ένα μόνο έμπειρο γνωματεύοντα για τον καθορισμό της ακριβείας εντός της εκτέλεσης.

Μία αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών από τον έλεγχο ακριβείας εντός της εκτέλεσης κατέδειξε πως 733/800 (91,63%) των σημείων δεδομένων εξέτασης μπόρεσαν να ερμηνευτούν. 40 σημεία εξέτασης αποκλείστηκαν λόγω παρουσίας DCIS και περαιτέρω 27 δεν μπόρεσαν να ερμηνευτούν λόγω απώλειας διηθητικού καρκίνου (αφορούσε 3 πυρήνες). Διακύμανση χρώσης συνέβη σε 61 (8,32%) από 733 πιθανά συμβάντα χρώσης. Σε 37 περιπτώσεις, παρατηρήθηκε διακύμανση από 3+ σε 2+ (n = 20) και από 1+ σε 0 (n = 17) και επομένως δεν θα συλλογιστεί μετάπτωση από κλινικά θετικό σε κλινικά αρνητικό και αντίστροφα σε αξιολόγηση δεδομένων 2x2. Οι υπόλοιπες 24 (3,27%) περιπτώσεις αντιπροσώπευαν μία μετάπτωση από κλινικά αρνητικό (0 ή 1+) σε κλινικά θετικό (2+ ή 3+). Τιμή επιτυχίας = 96,7% (ΔΑ 95% = 95,15% έως 97,81%).

B. Έλεγχος ακριβείας μεταξύ εκτελέσεων

Ο έλεγχος ακριβείας μεταξύ εκτελέσεων του Bond Oracle HER2 IHC System αξιολογήθηκε σε 24 διαδοχικές τομές που λήφθηκαν από μία TMA, αποτελούμενη από 20 διηθητικούς καρκίνους μαστού και 24 HER2 Control Slides. Όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System στο πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες αξιολογήθηκαν σε 8 ανεξάρτητες εκτελέσεις που διενεργήθηκαν στο ίδιο εργαστήριο σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, με χρήση ενός Bond Oracle HER2 IHC System της ίδιας κατασκευαστικής παρτίδας. Οι χρωσμένες τομές τυφλοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από ένα μόνο έμπειρο γνωματεύοντα για τον καθορισμό της ακριβείας μεταξύ των εκτελέσεων.

Μία αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών από τον έλεγχο ακριβείας μεταξύ των εκτελέσεων κατέδειξε πως 456/480 (95,00%) των σημείων δεδομένων εξέτασης μπόρεσαν να ερμηνευτούν. 24 σημεία δεδομένων δεν μπόρεσαν να ερμηνευτούν λόγω απώλειας διηθητικού όγκου (που αφορούσε 5 πυρήνες). Διακύμανση χρώσης συνέβη σε 42 (9,21%) από 456 πιθανά σημεία δεδομένων. Σε 30 περιπτώσεις, παρατηρήθηκε διακύμανση από 3+ σε 2+ (n = 10) και από 1+ σε 0 (n = 20) και επομένως δεν θα συλλογιστεί μετάπτωση από κλινικά θετικό ή αντίστροφα σε αξιολόγηση δεδομένων 2x2. Οι υπόλοιπες 12 (2,63%) περιπτώσεις αντιπροσώπευαν μία μετάπτωση από κλινικά αρνητικό (0 ή 1+) σε κλινικά θετικό (2+ ή 3+). Τιμή επιτυχίας = 97,37% (ΔΑ 95% = 95,90% έως 98,77%).

Γ. Αναπαραγωγιμότητα παρτίδας προς παρτίδα

Για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας παρτίδας προς παρτίδα, κατασκευάστηκαν 3 παρτίδες Bond Oracle HER2 IHC System υπό GMP σε 3 διαφορετικές περιπτώσεις και αξιολογήθηκαν σε 24 τομές καρκίνου του μαστού (24 σημεία δεδομένων εξέτασης) που λήφθηκαν από 4 διαφορετικά μπλοκ ιστών που είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμαλδεΐδη και σκηνωθεί σε παραφίνη (αντιπροσωπεύοντας τις εντάσεις χρώσης HER2 0, 1+, 2+ και 3+) και σε τρία HER2 Control Slides (12 σημεία δεδομένων μάρτυρα). Διενεργήθηκαν τρεις ανεξάρτητες εκτελέσεις εντός του ίδιου εργαστηρίου σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις. Σε κάθε

μία χρησιμοποιήθηκε διαφορετική κατασκευαστική παρτίδα του Bond Oracle HER2 IHC System. Όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System σε πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND. Οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι καλύφθηκαν και αξιολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από ένα μόνο έμπειρο γνωματεύοντα για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας παρτίδας προς παρτίδα.

Μία αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών (εξετάσεις και μάρτυρες) από την έρευνα παρτίδας προς παρτίδα κατέδειξε πως 36/36 σημεία δεδομένων δεν μπόρεσαν να ερμηνευτούν. Δεν συνέβη διακύμανση χρώσης στα 36 σημεία δεδομένων μεταξύ των τριών διαφορετικών κατασκευαστικών παρτίδων του Bond Oracle HER2 IHC System. Η χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System είναι συνεπής από κατασκευαστική παρτίδα σε κατασκευαστική παρτίδα.

Δ. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ εργαστηρίων

Ο έλεγχος αναπαραγωγιμότητας μεταξύ εργαστηρίων του Bond Oracle HER2 IHC System αξιολογήθηκε σε 3 τοποθεσίες, στις εγκαταστάσεις της Leica Biosystems Newcastle (Τοποθεσία Α), και δύο ανεξάρτητα εργαστήρια (τοποθεσίες Β και Γ) σε σύνολο 192 τομών από μία ΤΜΑ αποτελούμενη από 20 διηθητικούς όγκους μαστού και 24 HER2 Control Slides. Από τις 192 τομές της ΤΜΑ που υποβλήθηκαν σε χρώση, 96 υποβλήθηκαν σε χρώση με το HER2 Primary Antibody και 96 με το αντιδραστήριο HER2 Negative Control. Όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες υποβλήθηκαν σε χρώση με το Bond Oracle HER2 IHC System σε πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα BOND. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες αξιολογήθηκαν σε 8 ανεξάρτητες εκτελέσεις που διενεργήθηκαν σε κάθε μία από τις 3 διαφορετικές ερευνητικές τοποθεσίες με χρήση ενός Bond Oracle HER2 IHC System από την ίδια κατασκευαστική παρτίδα. Οι χρωσμένες αντικειμενοφόροι πλάκες τυφλοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν με τυχαίοποιημένο τρόπο από ένα μόνο έμπειρο γνωματεύοντα στις εγκαταστάσεις της Leica Biosystems, Newcastle για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας μεταξύ εργαστηρίων.

Μία αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλακών από την έρευνα αναπαραγωγιμότητας μεταξύ εργαστηρίων κατέδειξε πως 1477/1920 (76,93%) των σημείων δεδομένων εξέτασης μπόρεσαν να ερμηνευτούν. 443 σημεία δεδομένων εξέτασης δεν μπόρεσαν ερμηνευτούν λόγω:

α) εσφαλμένης απόδοσης της αντικειμενοφόρου πλάκας μάρτυρα HER2 σε 2/24 περιπτώσεις οδηγώντας σε αποκλεισμό 2 εκτελέσεων/160 σημείων δεδομένων εξέτασης. Αυτό το συμβάν συνέβη μία φορά στην τοποθεσία Α και μία φορά στην τοποθεσία Β (αφαιρέθηκαν 80 σημεία δεδομένων εξέτασης ανά ερευνητική τοποθεσία).

β) Απόκλιση από το σχέδιο ελέγχου στην τοποθεσία Γ, κατά την οποία 24 αντικειμενοφόροι αντιχρώθηκαν χειροκίνητα με αιματοξυλίνη μετά από χρώση με Bond Oracle HER2 IHC System. Αυτό οδήγησε σε υπερβολική αντίχρωση τόσο των αντικειμενοφόρων πλακών μαρτύρων HER2 όσο και των ΤΜΑ με αποτέλεσμα την αφαίρεση 240 σημείων δεδομένων εξέτασης

γ) Απώλεια διηθητικού ιστού που οδήγησε σε αφαίρεση 23 σημείων δεδομένων εξέτασης. Αυτό το συμβάν συνέβη σε 23 περιπτώσεις στην τοποθεσία Α και ήταν άμεσο αποτέλεσμα απώλειας ιστού κατά τη δημιουργία του μπλοκ ΤΜΑ από 192 διαδοχικές τομές ΤΜΑ που απαιτούνταν για την ολοκλήρωση αυτής της έρευνας.

δ) Μη ερμηνεύσιμη χρώση λόγω ανεπαρκούς πλύσης από το πλήρως αυτοματοποιημένο, προηγμένο σύστημα χρώσης BOND. οδηγώντας σε αφαίρεση 20 σημείων δεδομένων.

Μία αξιολόγηση των ερμηνεύσιμων αντικειμενοφόρων πλακών στην έρευνα ακρίβειας μεταξύ εργαστηρίων κατέδειξε πως σε 79 (5,28%) από 1477 πιθανά συμβάντα χρώσης συνέβη διακύμανση χρώσης. Από αυτά, 14/1477 (0,95%) περιπτώσεις αντιπροσώπευαν διακυμάνσεις από 0 σε 1+ ή από 2+ σε 3+ και ως τέτοιες, δεν αντιπροσώπευαν ενδεχόμενο μετάπτωσης από κλινικά θετικό σε κλινικά αρνητικό ή αντίστροφα σε αξιολόγηση δεδομένων 2x2. Τιμή επιτυχίας = 99,05% (ΔΑ 95% = 98,42% έως 99,46%). Από τα 14 συμβάντα χρώσης, 5/1477 (0,34%) συμβάντα χρώσης συνέβησαν στις εγκαταστάσεις της Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Τοποθεσία Α), 8/1477 (0,54%) συνέβησαν στην Τοποθεσία Β και 1/1477 (0,07%) συνέβη στην Τοποθεσία Γ.

Τα υπόλοιπα 65/1477 (4,40%) συμβάντα χρώσης επέδειξαν διακύμανση από 2+ σε 1+ ή από 2+ σε 0 και επομένως θα αντιπροσώπευαν μετάπτωση από κλινικά θετικό σε κλινικά αρνητικό ή αντίστροφα σε αξιολόγηση δεδομένων 2x2. Τιμή επιτυχίας = 95,6% (ΔΑ 95% = 94,42% έως 96,54%). Από τις 65 κλινικά σημαντικές μεταβολές, 11/65 (16,9%) συνέβησαν στις εγκαταστάσεις της Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Τοποθεσία Α), 24/65 (36,9%) συνέβησαν στην Τοποθεσία Β και 30/65 (46,1%) συνέβησαν στην τοποθεσία Γ. Από τις κλινικά σημαντικές μεταβολές, σε καμία περίπτωση δεν υπήρξε μετάπτωση αποτελέσματος από 3+ σε αρνητικό (0 ή 1+) ή αντίστροφα.

Ε. Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ γνωματεούντων

Από 40 τυχαία επιλεγμένα περιστατικά διηθητικού καρκίνου του μαστού, με ίση κατανομή κάθε μίας από τις βαθμολογίες HER2 IHC (ιστοτεμάχια εκτομής) λήφθηκαν τομές και παραδόθηκαν στην Leica Biosystems, Newcastle (Τοποθεσία Α), στην τοποθεσία Β και στην τοποθεσία C για χρώση και ερμηνεία. Οι τομές τυφλοποιήθηκαν και τυχαιοποιήθηκαν σε κάθε τοποθεσία πριν από τη βαθμολόγησή τους. Η μεταξύ των γνωματεούντων συμφωνία μεταξύ των δύο ανεξάρτητων κλινικών τοποθεσιών Β και C ανήλθε σε 87,5% (ΔΑ 95% = 73,3% έως 95,8%). Η συμφωνία μεταξύ της Τοποθεσίας Β και της Τοποθεσίας C και της Leica Biosystems Newcastle, Ltd ήταν 92,5% (ΔΑ 95% = 79,6% έως 98,4%) και 85% (ΔΑ 95% = 70,1% έως 94,29%) αντίστοιχα. Η ανάλυση της συνολικής σύμπτωσης μεταξύ των τριών γνωματεούντων (Α, Β, C) ήταν 82,50%.

Σ. Ακρίβεια μεταξύ οργάνων (BOND-MAX v BOND-III)

Ο έλεγχος ακριβείας μεταξύ οργάνων, έγινε με χρήση του Bond Oracle HER2 IHC System σε μία ανεξάρτητη, ευρωπαϊκή ερευνητική τοποθεσία. Τα δείγματα που εξετάστηκαν λήφθηκαν από μονιμοποιημένες σε φορμαλδεΐδη και σκηνωμένες σε παραφίνη ολικές τομές εκατόν τριάντα οκτώ (138) περιστατικά διηθητικού καρκίνου του μαστού (ιστοτεμάχια βελόνης μεγάλης διαμέτρου και ιστοτεμάχια εκτομής). Ο έλεγχος μεταξύ οργάνων εκτελέστηκε προοπτικά εντός της ερευνητικής τοποθεσίας, με χρώση διαδοχικών τομών στα συστήματα BOND-MAX και BOND-III. Τρία (3) περιστατικά θεωρήθηκαν ακατάλληλα λόγω ανεπάρκειας δείγματος/όγκου και αφαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Σε κάθε όργανο χρησιμοποιήθηκαν πανομοιότυποι αριθμοί παρτίδας Bond Oracle HER2 IHC System και συμπληρωματικών αντιδραστηρίων για το όργανο BOND. Οι τομές χρωματίστηκαν αναδρομικά. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες ερμηνεύτηκαν στην ερευνητική τοποθεσία από ένα μόνο έμπειρο γνωματεούντα, για τον καθαρισμό της ακριβείας μεταξύ των οργάνων.

Η αξιολόγηση των αντικειμενοφόρων πλάκων από τον έλεγχο ακριβείας μεταξύ οργάνων έδειξε συμφωνία 2x2 μεταξύ θετικών (2+, 3+) και αρνητικών (0, 1+) της τάξεως του 94,2% (130/138) με ΔΑ 95% από 88,9 έως 97,5% και συμφωνία 3x3 μεταξύ θετικών (3+), ύποπτων (2+) και αρνητικών (0, 1+) της τάξεως του 87,0% (120/138) με ΔΑ 95% από 80,2 έως 92,1%.

		BOND-MAX		
		Αρνητικά (0/1+)	Θετικά (2/3+)	Σύνολο
BOND-III	Αρνητικά (0/1+)	80	1	81
	Θετικά (2/3+)	7	50	57
	Σύνολο	87	51	138

Συνολική Συμφωνία (ΔΑ 95%) = 94,2% (88,9 έως 97,5%)

Πίνακας 10. Συμφωνία χρώσης 2x2 με το Bond Oracle HER2 IHC System στα συστήματα BOND-MAX και BOND-III.

		BOND-MAX			
		Αρνητικά (0/1+)	Ύποπτα (2+)	Θετικά (3+)	Σύνολο
BOND-III	Αρνητικά (0/1+)	80	1	0	81
	Ύποπτα (2+)	6	5	1	12
	Θετικά (3+)	1	9	35	45
	Σύνολο	87	15	36	138

Συνολική Συμφωνία (ΔΑ 95%) = 87,0% (80,2 έως 92,1%)

Πίνακας 11. Συμφωνία χρώσης 3x3 με το Bond Oracle HER2 IHC System στα συστήματα BOND-MAX και BOND-III.

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα που παρήχθησαν σε αυτήν τη μελέτη καταδεικνύουν υψηλό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ των συστημάτων Leica Biosystems' BOND-MAX και BOND-III όταν αξιολογούνται με χρήση του Bond Oracle HER2 IHC System.

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Ενέργεια επίλυσης
Απουσία ανοσοϊστοχημικής χρώσης	Η εκτέλεση ακυρώθηκε πριν από την ολοκλήρωσή της	Με χρήση του λογισμικού BOND, επιβεβαιώστε την παρουσία οποιωνδήποτε αναφερόμενων σφαλμάτων κατά την εκτέλεση χρώσης και αντιμετωπίστε τα σύμφωνα με τις οδηγίες στο λογισμικό BOND.
	Λανθασμένη επιλογή πρωτοκόλλου	Βεβαιωθείτε πως η ενδεδειγμένη προεπιλογή είναι η *IHC Protocol H στο πεδίο πρωτοκόλλου χρώσης του πλαισίου διαλόγου Add slide.
	Ανεπαρκής αποπαραφίνωση των τομών	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί η λειτουργία *Dewax από το πεδίο Προετοιμασίας του πλαισίου διαλόγου Add slide.
	Διανομή ακατάλληλων ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων	Βεβαιωθείτε πως όλα τα αντιδραστήρια BOND έχουν τοποθετηθεί στους κατάλληλους περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως έχουν τοποθετηθεί στις ενδεδειγμένες θέσεις του οργάνου.
	Επιμόλυνση του BOND Wash Solution με αζίδιο του νατρίου	Χρησιμοποιήστε φρέσκο BOND Wash Solution παρασκευασμένο στην κατάλληλη πυκνότητα εργασίας.
Ασθενής ειδική ανοσοϊστοχημική χρώση	Λανθασμένη ανάκτηση επιτόπων	Βεβαιωθείτε πως έχουν τοποθετηθεί τα κατάλληλα αντιδραστήρια BOND Epitope Retrieval στους σωστούς περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως το λογισμικό BOND έχει προεπιλέξει το κατάλληλο πρωτόκολλο ανάκτησης επιτόπων *HIER 25 min with *ER1 (97) .
	Ακατάλληλη μονιμοποίηση ή επεξεργασία του δείγματος εξέτασης	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεΰδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδείκνυνται για το δείγμα που υποβάλλεται σε εξέταση.
	Το Bond Oracle HER2 IHC System χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης του	Βεβαιωθείτε πως το Bond Oracle HER2 IHC System χρησιμοποιείται εντός της καθορισμένης ημερομηνίας λήξης του.
Υπερβολική ειδική ανοσοϊστοχημική χρώση	Λανθασμένη ανάκτηση επιτόπων	Βεβαιωθείτε πως έχουν τοποθετηθεί τα κατάλληλα αντιδραστήρια BOND Epitope Retrieval στους σωστούς περιέκτες ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως το λογισμικό BOND έχει προεπιλέξει το *HIER 25 min with ER1 (97) .
	Διακύμανση χρώσης	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεΰδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδείκνυνται για το δείγμα που υποβάλλεται σε έλεγχο. Εάν είναι εφικτό, επαναλάβετε την εξέταση του περιστατικού με χρήση διαφορετικού μπλοκ. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, αξιολογήστε τις περιοχές με τα καλύτερα πρότυπα μονιμοποίησης σε συνδυασμό με μία αντίστοιχη τομή χρωσμένης με H&E.

Πρόβλημα	Πιθανή αιτία	Ενέργεια επίλυσης
Μη ειδική χρώση υποβάθρου	Διανομή ακατάλληλων ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων	Βεβαιωθείτε πως όλα τα αντιδραστήρια BOND έχουν τοποθετηθεί στο κατάλληλος περιέκτης ασυσκεύαστων αντιδραστηρίων και πως αυτοί έχουν τοποθετηθεί στις ενδεδειγμένες θέσεις του οργάνου.
	Ανεπαρκής αποπαραφίνωση των τομών	Βεβαιωθείτε πως έχει επιλεγεί *Dewax στο πεδίο Προετοιμασίας του πλαισίου διαλόγου Add slide.
	Μη ειδική ανοσοϊστοχημική διασταυρούμενη αντίδραση στον ιστό	Ανατρέξτε στην περιγραφή του Bond Oracle HER2 IHC System σχετικά με την φυσιολογική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ιστού (ανατρέξτε στον Πίνακα 13).
	Μη ειδική ανοσοϊστοχημική διασταυρούμενη αντίδραση με περιοχές νεκρωτικού ιστού	Βεβαιωθείτε πως έχει χρησιμοποιηθεί μονιμοποιητικό με βάση τη φορμαλδεΐδη και πως τα χρονοδιαγράμματα επεξεργασίας ενδεικνύονται για το δείγμα που υποβάλλεται σε έλεγχο. Εάν είναι εφικτό, επαναλάβετε τον έλεγχο του περιστατικού με χρήση διαφορετικού μπλοκ. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, αξιολογήστε τις περιοχές με τα καλύτερα πρότυπα μονιμοποίησης σε συνδυασμό με μία αντίστοιχη τομή χρωσμένης με H&E.
	Τεχνικό σφάλμα ξήρανσης μετά την ολοκλήρωση μίας εκτέλεσης χρώσης	Εάν οι αντικειμενοφόροι πλάκες πρόκειται να υποβληθούν σε εκτέλεση κατά τη διάρκεια της νύχτας, συνιστάται η χρήση της λειτουργίας καθυστερημένης έναρξης του BOND. Βεβαιωθείτε πως υπάρχει επαρκής όγκος απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού για τη διανομή στις αντικειμενοφόρους πλάκες για αυτό το διάστημα, ώστε να μην ξηρανθούν οι αντικειμενοφόροι πλάκες.
	Τομές προσκολλημένες στις αντικειμενοφόρους πλάκες με τη βοήθεια προσθέτων αμύλου	Χρησιμοποιήστε αντικειμενοφόρους πλάκες χωρίς άμυλο (Leica BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 ή Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040).
Αποκολλημένος ιστός από αντικειμενοφόρο/-ους πλάκα/-ες ασθενούς/μάρτυρα	Χρήση λανθασμένου τύπου αντικειμενοφόρων πλακών ή ακατάλληλη αποστράγγιση της τομής	Βεβαιωθείτε πως χρησιμοποιούνται κατάλληλες αντικειμενοφόροι πλάκες για τις τομές ασθενούς/μάρτυρα (Leica BOND Plus Slides – κωδικός προϊόντος S21.2113 ή Apex BOND Slides κωδικός προϊόντος 3800040) Βεβαιωθείτε πως οι αντικειμενοφόροι πλάκες υποβάλλονται σε κατάλληλη αποστράγγιση και πως επωάζονται για 12–18 ώρες στους 37 °C (κατά τη διάρκεια της νύχτας). Οι τομές που απαιτούν περαιτέρω προσκόλληση μπορούν να επωαστούν στους 60 °C για ακόμη μία ώρα.

Πίνακας 12. Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων για το Bond Oracle HER2 IHC System.

Εάν συναντήσετε οποιοδήποτε πρόβλημα με το Bond Oracle HER2 IHC System το οποίο δεν αναφέρεται στον οδηγό αντιμετώπισης προβλημάτων (ανατρέξτε στον Πίνακα 12), επικοινωνήστε με το τοπικό Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της Leica Biosystems' ή με το διανομέα.

Βιβλιογραφία

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
10. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
11. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990; 17: 234-247.
12. 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
13. 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.
14. 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. Nadji, 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.

Προσθήκες στην προηγούμενη έκδοση

Παρεχόμενα συστατικά, Ερμηνεία των συμβόλων.

Ημερομηνία έκδοσης

16 Ιουλίου 2020

Ερμηνεία των συμβόλων

	Κωδικός παρτίδας		Φύλαξη		Αριθμός καταλόγου
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν		Κατασκευαστής		Εύθραστο
	eIFU - Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Επαρκές περιεχόμενο για <n> εξετάσεις		Ημερομηνία λήξης EEEE-MM-HH
SN	Αριθμός σειράς	Rx Only	Μόνο με συνταγή		

Το HercepTest™ είναι εμπορικό σήμα και υπόκειται σε άδειες ιδιοκτησίας της DakoCytomation, Denmark A/S
Το Herceptin® είναι εμπορικό σήμα της Genentech, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.