

# Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

## Instruções de uso

Para uso no sistema de coloração avançada BOND™ totalmente automatizado da Leica Biosystems.

O Product Code TA9145 é projetado para colorir 60 testes (150 lâminas):

60 lâminas de teste com HER2 Primary Antibody

60 lâminas de teste com HER2 Negative Control

15 HER2 Control Slides HER2 Primary Antibody

15 controles de tecido internos com 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 Waverly VIC 3149  
Australia  
☎ +61 2 8870 3500

# Sumário

<b>Uso pretendido</b> .....	<b>3</b>
<b>Resumo e explicação</b> .....	<b>3</b>
Histórico .....	3
A expressão de HER2 .....	3
Resumo de concordância clínica .....	3
<b>Princípios do procedimento</b> .....	<b>4</b>
Componentes fornecidos .....	4
Instruções de uso .....	5
Armazenamento e estabilidade .....	5
Preparação da amostra .....	5
Advertências e precauções .....	5
<b>Procedimento</b> .....	<b>6</b>
A. Reagentes necessários, mas não fornecidos .....	6
B. Equipamentos necessários, mas não fornecidos .....	6
C. Metodologia .....	6
D. Layout da lâmina .....	7
E. Etapas de procedimento .....	7
<b>Controle de qualidade</b> .....	<b>9</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	10
Tecido de controle positivo interno – HER2 Primary Antibody .....	10
Componente de tecido de controle negativo interno - HER2 Primary Antibody .....	11
Tecido do paciente – HER2 Negative Control .....	11
Tecido do paciente – HER2 Primary Antibody .....	11
Verificação do ensaio .....	11
Interpretação da coloração .....	12
<b>Sequência lógica de triagem das lâminas</b> .....	<b>12</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	12
2. Tecido de controle positivo interno – HER2 Primary Antibody .....	13
3. Componente do tecido de controle negativo interno – HER2 Positive Control .....	13
4. Tecido do paciente – coloração usando o HER2 Negative Control .....	13
5. Tecido do paciente – colorido usando o HER2 Primary Antibody .....	13
<b>Limitações</b> .....	<b>13</b>
A. Limitações gerais .....	13
B. Limitações específicas do produto .....	14
<b>Dados da linha da célula</b> .....	<b>15</b>
<b>Concordância clínica do Bond Oracle HER2 IHC System vs. Dako HercepTest</b> .....	<b>15</b>
Resultados de concordância 2x2 .....	16
Resultados de concordância 3x3 .....	16
<b>Concordância clínica do Bond Oracle HER2 IHC System com vs. PathVysion HER-2 DNA Probe Kit</b> .....	<b>17</b>
Resultados de concordância 3x2 .....	17
<b>Imunorreação – painel normal</b> .....	<b>18</b>
<b>Estudo sobre reprodutibilidade</b> .....	<b>19</b>
Teste de precisão interno e entre .....	19
A. Teste de precisão de operação interna .....	19
B. Teste de precisão entre operações .....	19
C. Reprodutibilidade de lote a lote .....	19
D. Reprodutibilidade entre laboratórios .....	20
E. Reprodutibilidade interobservadores .....	21
F. Precisão entre instrumentos (BOND-MAX vs. BOND-III) .....	21
<b>Solução de problemas</b> .....	<b>23</b>
<b>Referências</b> .....	<b>25</b>
Adições à edição anterior .....	26
Data da edição .....	26
<b>Identificação dos símbolos</b> .....	<b>26</b>

# Uso pretendido

## Para uso em diagnóstico in vitro

O Bond Oracle HER2 IHC System é um ensaio imuno-histoquímico semiquantitativo (IHC) para determinar o status da oncoproteína HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) em tecidos de câncer de mama processados para avaliação histológica. O Bond Oracle HER2 IHC System é indicado como um auxílio na avaliação de pacientes com possível indicação de tratamento com Herceptin® (trastuzumab) (veja a bula do Herceptin®).

Obs.: Todos os pacientes nos testes clínicos com Herceptin® foram selecionados por meio de um Ensaio de Avaliação Clínica (CTA) imunocitoquímica investigativa. Nenhum dos pacientes nestes testes foram selecionados usando Bond Oracle HER2 IHC System. O Bond Oracle HER2 IHC System foi comparado ao Dako HercepTest™ em um conjunto independente de amostras e pretendia fornecer resultados semelhantes aceitáveis, conforme indicado no resumo de concordância clínica. A correlação real do Bond Oracle HER2 IHC System para o resultado clínico não foi estabelecida.

## Resumo e explicação

### Histórico

O Bond Oracle HER2 IHC System contém o anticorpo monoclonal HER2 de ratos, clone CB11. O clone CB11, originalmente desenvolvido por Corbett et al (1) e fabricado pelo Newcastle Laboratories Ltd (agora Leica Biosystems Newcastle Ltd), foi direcionado contra o domínio interno da oncoproteína HER2.

Em uma parte de pacientes com câncer de mama, a oncoproteína HER2 é superexpressa como parte do processo de transformação maligna e do desenvolvimento do tumor (2). A superexpressão da oncoproteína HER2 encontrada nas células cancerígenas da mama sugere a HER2 como um alvo para uma terapia baseada em anticorpos. O Herceptin® é um anticorpo monoclonal humanizado (3) que se une com alta afinidade à oncoproteína HER2 e tem demonstrado inibir a proliferação de células de tumor humano que superexpressam a oncoproteína HER2 tanto in vitro quanto in vivo (4–6).

Desde a primeira técnica de imunoperoxidase, reportada por Nakane e Pierce (7), houve muitos desenvolvimentos no campo de imuno-histoquímica que resultaram em maior sensibilidade. Um desenvolvimento recente foi o uso do rótulo polimérico. Esta tecnologia foi aplicada em sistemas de detecção imuno-histoquímico e anticorpos primários (8). O sistema de detecção Compact Polymer™ utilizado pelo Bond Oracle HER2 IHC System é parte de uma família de novas tecnologias de polimerização controlada que foram especificamente desenvolvidas para preparar anticorpos vinculados a HRP poliméricos cognatos. Como esta tecnologia de polímeros é utilizada na linha de produtos Oracle, não ocorre o problema da coloração de biotina endógena não específica que pode ser vista com sistemas de detecção de biotina/estreptavidina.

### A expressão de HER2

A oncoproteína HER2 é expressa em níveis detectáveis por imuno-histoquímica em até 20% de adenocarcinomas de vários locais. Entre 10% e 20% de carcinomas ductais de mama são positivos para a oncoproteína HER2 (9). 90% dos casos de carcinoma ductal in situ (DCIS) de tipo comedão são positivos (10), juntamente com quase todos os casos de doença de Paget da mama (11).

### Resumo de concordância clínica

O Bond Oracle HER2 IHC System foi desenvolvido para fornecer uma alternativa ao ensaio de avaliação clínica (CTA) investigativo usado nos estudos clínicos do Herceptin®. O desempenho do Bond Oracle HER2 IHC System para determinar a superexpressão da oncoproteína HER2 foi avaliado em um estudo independente que compara os resultados do Bond Oracle HER2 IHC System ao Dako HercepTest em 431 amostras de tumores de mama nos EUA. Nenhuma dessas amostras de tumor foi obtida de pacientes em experimentos clínicos com Herceptin®. Os resultados indicam uma concordância de 92,34% em uma análise 2x2 (95% de confiança em intervalos de 89,42% a 94,67%) e 86,54% em uma análise 3x3 (95% de confiança em intervalos de 82,95% a 89,62%) entre os resultados dos dois ensaios.

## Princípios do procedimento

O Bond Oracle HER2 IHC System contém os componentes necessários para concluir um procedimento de coloração imuno-histoquímica para tecidos embebidos em parafina fixada com formol. Após a incubação com o HER2 Primary Antibody (clone CB11) pronto para usar, este sistema emprega a tecnologia de polímeros compactos prontos para usar. A conversão enzimática dos cromógenos adicionados posteriormente resulta na formação de um produto de reação visível no local antígeno. As secções do tecido podem ser contracoloridas, desidratadas, limpas e montadas. Os resultados são interpretados com um microscópio leve. As lâminas de controle com quatro linhas de células de câncer de mama humano embebidos em parafina fixada com formol são fornecidas para validar as linhas de coloração. As quatro linhas da célula demonstram a expressão da oncoproteína HER2 em intensidades 0, 1+, 2+ e 3+. A intensidade de coloração dessas linhas da célula relacionam-se tanto à carga do receptor da oncoproteína HER2 por célula quanto ao status de ampliação do gene da HER2.

O Bond Oracle HER2 IHC System (product code TA9145) deve ser usado no sistema de coloração avançada BOND da Leica Biosystems totalmente automatizado.

## Componentes fornecidos

Os materiais listados abaixo (Tabela 1) são suficientes para colorir 150 lâminas (60 lâminas de teste incubadas com HER2 Primary Antibody, 60 lâminas de teste correspondentes incubadas com HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides incubadas com HER2 Primary Antibody e 15 controles de tecido positivo interno incubado com o HER2 Primary Antibody). O número de testes é baseado no uso de um recipiente de 150 µl automatizado por lâmina. O kit fornece materiais suficientes para um máximo de 15 operações de coloração BOND individuais.

<b>HER2 Control Slides, (x15)</b>	As secções de linhas de células de câncer de mama humano embebidas em parafina fixada com formol que demonstram a expressão da oncoproteína HER2 em intensidades de coloração 0, 1+, 2+ e 3+ quando coloridas de acordo com o protocolo fornecido. Essas secções são totalmente aderidas e não precisam de aquecimento adicional.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 ml</b>	Contém o anticorpo IgG monoclonal de rato, purificado por afinidade e pronto para usar, clone CB11 e 0,35% ProClin™ 950.
<b>HER2 Negative Control, 9 ml</b>	Contém IgG de rato pronto para usar em uma concentração equivalente ao HER2 Primary Antibody e 0,35% de ProClin™ 950.
<b>Peroxide Block, 22,5 ml</b>	Contém 3-4% de peróxido de hidrogênio.
<b>Post Primary, 22,5 ml</b>	IgG (<10 µg/ml) de coelho antirrato em solução salina tamponada com Tris que contém 10% (v/v) de soro animal e 0,09% de ProClin™ 950.
<b>Polymer, 22,5 ml</b>	IgG (<25 µg/ml) de cabra anticoelho poli-HRP em solução salina tamponada com Tris que contém 10% (v/v) de soro animal e 0,09% de ProClin™ 950.
<b>DAB Part 1, 2,25 ml</b>	Contém tetra-hidrocloroeto diaminobenidina 66 mM 3,3' em uma solução estabilizante.
<b>DAB Part B (x2), 22,5 ml</b>	Contém ≤0,1% (v/v) de peróxido de hidrogênio.
<b>Hematoxylin, 22,5 ml</b>	Contém <0,1% de hematoxilina.

Tabela 1. Componentes do Bond Oracle HER2 IHC System

## Instruções de uso

Todos os reagentes fornecidos são especificamente formulados para usar com este ensaio e os números de lotes são específicos para cada Bond Oracle HER2 IHC System. Para que o ensaio seja válido, não se deve fazer nenhuma substituição.

## Armazenamento e estabilidade

Armazene a 2–8 °C. Não congele. Volte a 2–8 °C imediatamente após o uso. Qualquer desvio dessas condições invalidará o ensaio. Certifique-se de que o Oracle HER2 IHC System usado esteja dentro de sua data de validade designada. Os sinais que indicam contaminação e/ou instabilidade do Bond Oracle HER2 IHC System são: turbidez das soluções, cheiro e presença de precipitação. As condições de armazenamento diferentes das especificadas acima devem ser verificadas pelo usuário.

## Preparação da amostra

Todas as amostras devem ser preparadas para preservar o tecido para coloração imunohistoquímica. Os métodos padrão de processamento de tecidos devem ser usados para todas as amostras (12).

Recomenda-se que os tecidos sejam preparados em fixadores baseados em formol e diariamente processados e embebidos em parafina. Por exemplo, amostras de re-seção devem ser bloqueadas em uma espessura de 3–4 mm e fixadas por 18–24 horas em 10% de formol tamponado neutro. Os tecidos devem ser desidratados em uma série de álcoois e limpas com xileno, seguidas pela impregnação com cera de parafina fundida, mantida a 60 °C, no máximo. As amostras de tecidos devem ser seccionadas entre 3–5 µm.

As lâminas necessárias para a avaliação da oncoproteína HER2 e a verificação do tumor devem ser preparadas ao mesmo tempo. Para conservar a antigenicidade, as seções de tecidos montadas nas lâminas (Leica BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040) devem ser coloridas dentro de 4 a 6 semanas de seção quando mantidas em uma temperatura ambiente de (18–24 °C). Após a seção, recomenda-se que as lâminas fiquem incubadas por 12 a 18 horas (a noite toda) a 37 °C. As seções que precisam de aderência extra podem ser incubadas a 60 °C por mais tempo.

Nos EUA, a Clinical Laboratory Improvement Act de 1988 exige em 42 CFR 493.1259(b) que “O laboratório deve manter as lâminas coloridas por pelo menos dez anos a partir da data do exame e manter os blocos de amostra por pelo menos dois anos a partir da data da análise”.

## Advertências e precauções

*Para usuários profissionais somente.*

Um ou mais componentes no produto são perigosos.

Como regra, as pessoas com menos de 18 anos não podem trabalhar com este produto. Os usuários devem ser cuidadosamente instruídos sobre o procedimento de trabalho, as propriedades perigosas do produto e as instruções de segurança necessárias.

Sintomas de superexposição a ProClin™ 950, o conservante usado nos reagentes Oracle pode causar irritação da pele e dos olhos, bem como das membranas mucosas e do trato respiratório superior. A concentração de ProClin™ 950 neste produto é de 0,35% no máximo. Essas soluções não atendem aos critérios da OSHA para substâncias perigosas. Uma Material Safety Data Sheet está disponível mediante solicitação ou em [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

As amostras, antes e depois da fixação, bem como todos os materiais expostos a elas, devem ser manuseadas como se fossem capazes de transmitir doenças infecciosas e descartadas com as devidas precauções.

Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contato da pele e membranas mucosas com reagentes e amostras. Se os reagentes ou as amostras entrarem em contato com áreas sensíveis, lave-as com água corrente abundante. Procure aconselhamento médico. Consulte as regulamentações federais, estaduais ou locais para descartar componentes potencialmente tóxicos.

Minimize a contaminação microbiana de reagentes para que não ocorra uma coloração não específica.

## Procedimento

### A. Reagentes necessários, mas não fornecidos

- BOND Dewax Solution (cód. produto AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (cód. produto AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (cód. produto AR9590)
- Solventes padrão usados em imuno-histoquímica (ex.: etanol absoluto e graduado)
- Xileno (ou produtos substitutos)
- Meio de montagem
- Água destilada ou desionizada

### B. Equipamentos necessários, mas não fornecidos

- Sistema(s) de coloração avançada, BOND-MAX e BOND-III totalmente automatizado(s) da Leica Biosystems
- BOND Universal Covertiles™ (cód. produto S21.2001, S21.4583 ou S21.4611)
- BOND Mixing Stations (cód. produto S21.1971)
- Incubadora, capaz de manter 60 °C
- Microscópio leve (amplificação da objetiva de 4–40x)
- Lâminas (Leica BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040)
- Lamínulas
- BOND Slide Label & Print Ribbon (cód. produto S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (cód. produto CS9100)

### C. Metodologia

- Antes de realizar esta metodologia, os usuários devem ser treinados nas técnicas de imuno-histoquímica totalmente automatizada BOND.
- Cada secção de teste a ser colorida com HER2 Primary Antibody precisará de uma secção idêntica para coloração com o HER2 Negative Control. A secção de controle negativo permite a distinção entre a coloração específica e não específica no local antígeno. Cada operação de coloração BOND deve incluir uma HER2 Control Slide. No final do protocolo de coloração, se as linhas da célula não demonstram os padrões de coloração corretos (consulte o Bond Oracle HER2 IHC Systems Interpretation Guide), a operação deve ser considerada inválida.

### D. Layout da lâmina

Um novo BOND Universal Covertile (cód. produto S21.2001, S21.4583 ou S21.4611) deve ser usado com cada lâmina. O uso das BOND Universal Covertiles que foi previamente utilizado para coloração imuno-histoquímica ou por hibridização in situ não foi validado com este teste.

O layout da bandeja de amostras (Tabela 2) permite o desempenho ótimo do Bond Oracle HER2 IHC System e que sejam obtidos 60 testes.

Posição da lâmina	Descrição da lâmina	Reagente	Tipo de tecido	Ícone da lâmina
1	Estojó 1	*HER2 Negative Control	Teste	
2	Estojó 2	*HER2 Negative Control	Teste	
3	Estojó 3	*HER2 Negative Control	Teste	
4	Estojó 4	*HER2 Negative Control	Teste	
5	Estojó 1	*HER2PrimaryAntibody	Teste	
6	Estojó 2	*HER2PrimaryAntibody	Teste	
7	Estojó 3	*HER2PrimaryAntibody	Teste	
8	Estojó 4	*HER2PrimaryAntibody	Teste	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	
10	Controle de tecido interno	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	

Tabela 2. Layout da bandeja de lâminas mostrando o tipo de tecido e o reagente

## E. Etapas de procedimento

Siga as etapas abaixo para configurar uma bandeja de amostras com o layout descrito na tabela 2. Essas instruções devem ser lidas junto com o BOND System User Manual.

1. No aparelho BOND, certifique-se de que os recipientes a granel e de resíduos perigosos tenham capacidade suficiente para realizar as operações de coloração necessárias.
2. Certifique-se de que há álcool, água destilada ou desionizada, BOND Dewax Solution (fornecida como pronto para o uso), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (fornecida pronta para o uso) e BOND Wash Solution (fornecida como concentração x10) suficientes nos recipientes de reagentes a granel para realizar as operações de coloração necessárias.
3. Assegure-se de que uma BOND Mixing Station limpa está instalada.
4. Ligue o sistema de coloração avançada e totalmente automatizado BOND.
5. Ligue o controlador BOND conectado ao sistema de coloração avançada e totalmente automatizado BOND.
6. Abra o software BOND.
7. Para um novo Bond Oracle HER2 IHC System, escaneie os códigos de barra da bandeja de reagentes com um scanner portátil para inserir o sistema no inventário de reagentes

- BOND.
8. Vá até a tela de configuração Slide e clique em Add case.
  9. Insira os detalhes para o primeiro caso. Certifique-se de que o volume no recipiente seja de 150 µl e de que o protocolo de preparação seja o \*Dewax. Clique em OK.
  10. Com o estojo selecionado na tela de configuração Slide, clique em Add slide.
  11. Primeiro, adicione as lâminas de teste do paciente. Assegure-se de que o tipo de tecido esteja definido como Test tissue.
  12. Confirme se o volume no recipiente é de 150 µl e se o protocolo de preparação é o \*Dewax.
  13. Selecione os valores do modo de coloração Single e Oracle (não clique em Oracle control).
  14. Selecione o processo IHC.
  15. Selecione \*HER2 Negative Control na lista de marcadores. Por padrão, a guia Protocols está no protocolo de coloração correto (\*IHC Protocol H) e o protocolo HIER (\*HIER 25 min with ER1 (97)).
  16. Clique em Add slide. A lâmina de reagente de controle negativo é criada.
  17. Ainda na caixa de diálogo Add slide, selecione \*HER2 Primary Antibody na lista de marcadores. Os protocolos padrão e todas as outras configurações permanecem inalteradas.
  18. Clique em Add slide. A lâmina de teste é criada.
  19. Repita as etapas 8 a 18 até que todos os estojos e lâminas de teste dos pacientes tenham sido criados.
  20. Em seguida, crie o HER2 Control Slide. Acrescente-o ao último estojo ou crie um novo para as lâminas de controle, dependendo das práticas de seu laboratório.  
  
Nota importante: O Bond Oracle HER2 IHC System exige que um HER2 Control Slide seja incluído em cada operação (ou seja, bandeja de lâminas) para que o ensaio seja validado.
  21. Na caixa de diálogo Add slide, configure o tipo de tecido como Positive tissue.
  22. Clique em Oracle control.
  23. Selecione o número do lote do HER2 Control Slide na lista Lot No. O número do lote está inscrito na área da etiqueta da lâmina.  
  
Nota importante: O HER2 Control Slide deve vir do mesmo Bond Oracle HER2 IHC System que será usado.
  24. Selecione \*HER2 Primary Antibody na lista de marcadores. Mantenha o volume do recipiente, o modo de coloração e as configurações de processo e protocolo.
  25. Clique em Add slide para adicionar o HER2 Control Slide.
  26. Finalmente, adicione uma lâmina de controle de tecidos interno positivo.
  27. Desmarque Oracle control.
  28. Selecione \*HER2 Primary Antibody na lista de marcadores. Mantenha o volume do recipiente, o modo de coloração e as configurações de processo e protocolo. O tipo de tecido permanece Positive tissue.
  29. Clique em Add slide. A criação da lâmina está concluída.
  30. Imprima os rótulos das lâminas. Todas as lâminas Oracle têm "OC" impresso. O rótulo



para o HER2 Control Slide também inclui o número do lote do Bond Oracle HER2 IHC System.

31. Coloque os rótulos nas lâminas corretamente.
32. Abra as tampas de todos os recipientes do Bond Oracle HER2 IHC System e encha a bandeja de reagente no BOND.
33. Coloque as lâminas na bandeja na sequência indicada na seção D, tabela 2. Aplique novos Covertiles.
34. Carregue o bandeja de lâminas no BOND e pressione o botão Load/Unload.
35. Confirme se as lâminas foram escaneadas e clique no botão Run (Play) na tela de status do sistema.
36. Certifique-se de que o campo do indicador de bandeja exibe Proc (OK) e de que o número do lote e a hora de conclusão sejam exibidos.
37. Quando a operação for concluída, pressione o botão Load/Unload e remova as bandejas de lâminas do BOND.
38. Remova Covertiles e enxágue as lâminas com água desionizada.
39. Desidrate, limpe e monte as secções.

## Controle de qualidade

As diferenças na fixação, no processamento e na inclusão do tecido no laboratório do usuário podem resultar em variações significativas que precisam de desempenho regular de controles internos, além dos HER2 Control Slides fornecidos pela Leica Biosystems no Bond Oracle HER2 IHC System. Consulte as orientações de controle de qualidade da College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry; veja também CLSI (antigo

NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12) e Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (13). Adicionalmente, consulte a tabela 3 abaixo para os tipos de controles de qualidade de imuno-histoquímico e seus objetivos.

Amostra*	Descrição	Coloração HER2 Primary Antibody	Coloração HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	Como fornecido no Bond Oracle HER2 IHC System.	Controla o procedimento de coloração e indica a validade do desempenho do reagente.	Detecção de coloração de fundo não específico
Tecido de controle de tecido interno	Tecido que contém antígeno alvo. O controle ideal é o tecido com coloração fracamente positiva de forma que defina sutis alterações na sensibilidade do anticorpo primário.	Controla todas as etapas da análise. Valida a preparação do tecido e o desempenho de coloração do Bond Oracle HER2 IHC System.	
Componente de tecido de controle negativo interno	Tecidos e células que provavelmente sejam negativos (podem estar localizados no tecido do paciente ou nos componentes do tecido de controle positivo/negativo).	Detecção de reação cruzada de anticorpos não específicos com os componentes celulares/ células.	

\*Fixada e processada de acordo com a amostra do paciente

Tabela 3. Controles de qualidade imuno-histoquímico e seus objetivos

O tecido de controle deve ser amostras de biópsia ou cirúrgicas, fixadas e processadas em parafina fixada com formol assim que possível e, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do paciente. Todas as amostras devem ser manuseadas corretamente para preservar a antigenicidade do tecido para coloração imuno-histoquímica. Os métodos padrão de processamento de tecidos devem ser empregados para todas as amostras (12).

### HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Cada uma das HER2 Control Slides contém quatro cores de linha de células de câncer de mama humana embebidas em parafina fixada com formol com classificações de intensidade de coloração 0, 1+, 2+ e 3+. Uma amostra deve ser incluída em cada operação de teste (ou seja, bandeja de amostra). A avaliação correta da HER2 Control Slide fornecida pela Leica Biosystems indica a validade do teste (consulte o Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). As HER2 Control Slides fornecidas com este sistema validam o desempenho do reagente somente e não verificam a preparação do tecido.

### Tecido de controle positivo interno – HER2 Primary Antibody

Se os componentes de tecido de controle positivo interno forem usados, eles devem ser amostras de biópsia ou cirúrgicas, fixadas, embebidas e processadas assim que possível da mesma maneira que a(s) amostra(s) do paciente. Os controles de tecidos positivos indicam os tecidos preparados corretamente e técnicas de coloração válidas. Pelo menos um componente

de controle positivo para cada operação de teste deve ser incluído. A secção de controle positivo deve demonstrar coloração positiva fraca de forma que defina sutis alterações na sensibilidade do anticorpo primário.

OBS.: Componentes de tecido de controle positivo devem ser utilizados apenas para monitoração do desempenho correto de tecidos processados junto com os reagentes de testes, NÃO como um auxílio na formulação de uma interpretação específica das amostras do paciente. Se o tecido de controle positivo falhar ao demonstrar a coloração positiva correta, os resultados obtidos com amostras de pacientes devem ser considerados inválidos.

Um bloco de controle de múltiplos tecidos contendo tumores que representam todas as 4 classes de HER2 também pode ser utilizado de forma eficiente conforme adequado no material de controle interno.

### **Componente de tecido de controle negativo interno – HER2 Primary Antibody**

Se os componentes de tecido de controle negativo interno forem usados, eles devem ser amostras de biópsia ou cirúrgicas frescas, embebidas e processadas assim que possível da mesma maneira que a(s) amostra(s) do paciente. O uso do tecido de controle, conhecido por ser a oncoproteína HER2 negativa, com cada operação de coloração verifica a especificidade do anticorpo primário e fornece uma indicação de coloração de fundo não específica. A variedade de diferentes tipos de células presentes em muitas secções de tecido oferece locais de controle negativo interno (deve ser verificado pelo usuário). Os ductos de mama normais não associados ao tumor podem fornecer uma referência à validade do ensaio. Se a coloração específica ocorrer no tecido de controle negativo interno, os resultados com as amostras do paciente devem ser considerados inválidos.

O uso de bloco de controles de múltiplos tecidos que representam as quatro classes de HER2 podem ser utilizadas para fins de tecidos de controle positivo e negativo.

### **Tecido do paciente – HER2 Negative Control**

Use o HER2 Negative Control fornecido no lugar do HER2 Primary Antibody em uma secção correspondente para cada teste de paciente para avaliar a coloração não específica e permitir a interpretação precisa da coloração específica da oncoproteína HER2 no local antígeno.

### **Tecido do paciente – HER2 Primary Antibody**

A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração de fundo não específica com o HER2 Negative Control. Como em qualquer teste imuno-histoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado e não que o antígeno estava ausente nas células/tecidos examinados. Consulte Slide Screening Order Rationale, Limitations, Performance Evaluation and Immunoreactivity para informações sobre a imunorreação do Bond Oracle HER2 IHC System.

### **Verificação do ensaio**

Antes do uso inicial de qualquer sistema de coloração ou anticorpo em um procedimento de diagnóstico, o usuário deve verificar a especificidade do anticorpo testando-o em uma série de tecidos internos com perfis positivo e negativo conhecidos de imuno-histoquímico. Consulte controle de qualidade como descrito anteriormente e as especificações de controle de qualidade do CAP Certification Program for Immunohistochemistry e/ou CLSI (antigo NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12). Esses procedimentos de controle de qualidade devem ser repetidos para cada novo lote de anticorpos ou sempre que houver uma alteração nos parâmetros do ensaio. Os carcinomas ductais de mama invasivos humanos (infiltrantes) com intensidades conhecidas de coloração da oncoproteína HER2 a

partir de 0 a 3+ e outros tecidos devidamente negativos são adequados para a verificação do ensaio.

## Interpretação da coloração

Para a determinação da expressão da oncoproteína HER2, somente o padrão e a intensidade de coloração da membrana devem ser avaliados usando a escala apresentada na tabela 4. Um patologista com um microscópio sobre fundo claro deve realizar a avaliação da lâmina. Para avaliação da classificação e da coloração de imuno-histoquímico, uma objetiva de amplificação de 10x é adequada. O uso da amplificação da objetiva de 20–40x deve ser usada na confirmação da classificação. A coloração citoplasmática deve ser considerada como não específica e não deve ser incluída na avaliação da intensidade da coloração da membrana (14). Para auxiliar na diferenciação da coloração 0, 1+, 2+ e 3+, consulte o Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide para ver imagens que representem as intensidades de coloração. Somente as amostras de pacientes com carcinoma de mama invasivo devem ser classificadas. Nos casos de carcinoma *in situ* e de carcinoma invasivo na mesma amostra, somente o componente invasivo deve ser classificado.

Padrão de coloração imuno-histoquímico	Classificação	Avaliação
Nenhuma coloração observada ou coloração da membrana observada em menos de 10% das células do tumor.	0	Negativo
A coloração fraca/quase imperceptível é detectada em mais de 10% das células de tumores. As células são coloridas somente na parte de suas membranas.	1+	Negativo
A coloração de clara a moderada de toda a membrana é observada em mais de 10% das células do tumor.	2+	Ambíguo (fracamente positivo)
Coloração forte de toda a membrana é observada em mais de 10% das células do tumor.	3+	Certamente positivo

Tabela 4. Interpretação da coloração da HER2

Os resultados de coloração do Bond Oracle HER2 IHC System são interpretados como negativos para a expressão da oncoproteína HER2 com classificações 0 e 1+ de intensidade de coloração, ambíguo (fracamente positivo) com uma classificação 2+ de intensidade de coloração e certamente positivo com uma classificação 3+ de intensidade de coloração. O Bond Oracle HER2 IHC System não pretende fornecer informações de prognóstico para o paciente e/ou médico e não foi validado para este fim. Para cada avaliação de coloração, as lâminas devem ser examinadas na sequência apresentada abaixo para determinar a validade da operação de coloração e permitir a avaliação semiquantitativa da intensidade de coloração da amostra do tecido.

## Sequência lógica de triagem das lâminas

As lâminas devem ser exibidas na seguinte sequência:

### 1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Um ensaio válido com o Oracle HER2 Control Slide mostra o seguinte:

- Presença de coloração marrom escura e completa da membrana da célula na linha da célula de controle 3+ SK-BR-3.

- Presença de coloração marrom clara a moderada e completa da membrana da célula na linha da célula de controle 2+ MDA-MB-453.
- Presença de coloração marrom bem claro/quase imperceptível e incompleta da membrana da célula na linha da célula de controle 1+ MDA-MB-175.
- Sem coloração na linha da célula de controle 0 MDA-MB-231.

Nota importante: Uma característica da linha de célula de controle 1+ MDA-MB-175 é um padrão de crescimento diferente em que as células formam grupos. Tais grupos formam uma região de borda esponjosa luminal por todo o grupo de células. A coloração desta borda esponjosa será mais forte que do resto da membrana da célula. O padrão correto de coloração 1+ da oncoproteína HER2 é a coloração fraca/quase imperceptível da membrana da célula. A imunocoloração pontilhada da região de Golgi no citoplasma também pode ser observada nesta linha da célula.

## 2. Tecido de controle positivo interno – HER2 Primary Antibody

A PRESENÇA da coloração da membrana marrom deve ser observada correspondendo ao status da oncoproteína HER2 conhecida do controle positivo escolhido.

## 3. Componente do tecido de controle negativo interno – HER2 Positive Control

AAUSÊNCIA da coloração da membrana deve ser observada. Um componente de tecido de controle negativo confirma a falta de reação cruzada do sistema de detecção para células/ componentes celulares especificamente examinados. Se a coloração da membrana ocorre em um componente tecido de controle negativo interno, os resultados com a amostra do paciente devem ser considerados inválidos.

## 4. Tecido do paciente – coloração usando o HER2 Negative Control

A AUSÊNCIA da coloração da membrana verifica o rótulo específico do antígeno alvo do anticorpo primário. Outra coloração marrom que ocorre no citoplasma da amostra tratada com o HER2 Negative Control, como tecidos conectivos, leucócitos, eritócitos ou tecido necrótico, deve ser considerada coloração de fundo não específica e deve ser observada.

## 5. Tecido do paciente – colorido usando o HER2 Primary Antibody

Os níveis de expressão da oncoproteína HER2 são determinados pelo critério definido na tabela 4 e no Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

## Limitações

### A. Limitações gerais

A imuno-histoquímica é uma técnica baseada em laboratório com várias etapas usada para auxiliar na interpretação e na determinação de características histopatológicas. Ela é uma técnica que precisa de treinamento especializado em todos os aspectos de procedimento (incluindo a seleção de reagentes adequados, tecidos, fixação, processamento e preparação da lâmina IHC) e de interpretação.

A coloração imuno-histoquímica do tecido depende do manuseio, da fixação e processamento do tecido antes da coloração. A fixação, o congelamento, o degelo, a lavagem, a secagem, o aquecimento, o seccionamento incorretos ou a contaminação com outros tecidos ou fluidos podem produzir capturas de anticorpos artificiais ou resultados negativos falsos. Resultados inconsistentes podem ser provenientes das variações de fixação, métodos de inclusão ou irregularidades inerentes dentro do tecido (15). A contracoloração excessiva ou incompleta também pode comprometer a interpretação correta dos resultados.

Geralmente, a coloração não específica, se houver, tem uma aparência difusa. A coloração esporádica de tecido conectivo também pode ser observado em secções de tecidos excessivamente fixados com formol. Use células intactas para a interpretação de resultados

da coloração. As células necróticas ou degeneradas frequentemente apresentam coloração não específica (16). Os resultados positivos falsos podem ser vistos devido à vinculação não imunológica de proteínas ou produtos de reação do substrato. Eles também podem ser causados por enzimas endógenas como pseudoperoxidase (eritócitos) ou peroxidase endógena (citocromo C), dependendo do tipo de coloração imuno-histoquímico usado.

Os tecidos de pacientes infectados com o vírus da hepatite B e que contenham antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) podem exibir coloração não específica com peroxidase de rábano silvestre (17).

A coloração imuno-histoquímica inesperada, ou as variações na coloração, pode ser resultado de alterações nos níveis de expressão da codificação de genes ou antígenos. Qualquer alteração nos padrões de coloração esperados deve ser interpretada em associação com todas as outras investigações de diagnóstico.

A interpretação da coloração imuno-histoquímica deve ser complementada por estudos morfológicos e pelo uso de material de controle adequado, além de ser avaliada dentro do contexto do histórico clínico do paciente e de outros testes de diagnósticos realizados por um patologista qualificado.

O desempenho do ensaio (ou seja, as avaliações da adequação dos controles positivos e negativos) e a interpretação de qualquer coloração imuno-histoquímica ou sua ausência devem ser executadas em um laboratório devidamente credenciado/licenciado sob a supervisão de um patologista qualificado e experiente que seja responsável pela avaliação geral do ensaio imuno-histoquímico e por sua avaliação.

## **B. Limitações específicas do produto**

Este produto não é destinado para o uso em citometria de fluxo. As características de desempenho não foram determinadas para a citometria de fluxo.

Os resultados negativos falsos podem ser vistos como um resultado da degradação de antígenos na secção do tecido. As lâminas necessárias para a avaliação da oncoproteína HER2 e a verificação do tumor devem ser preparadas ao mesmo tempo. Para conservar a antigenicidade, as secções de tecidos montadas nas lâminas (Leica BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040) devem ser coloridas dentro de 4–6 semanas de secção quando mantidas a uma temperatura ambiente de (18–24 °C). Após o seccionamento, recomenda-se que as lâminas sejam incubadas por 12–18 horas a 37 °C. As secções que precisam de aderência extra podem ser incubadas a 60 °C por mais tempo.

A variação natural mínima do perfil imuno-histoquímico será vista entre lotes de crescimento das linhas de célula utilizadas dentro do Bond Oracle HER2 IHC System. Esta variação natural é boa dentro dos níveis de tolerância aceitáveis de uma entidade biológica e não afeta a interpretação ou o desempenho do sistema.

A caracterização das linhas da célula usando a citometria de fluxo e a hibridização in situ conforme apresentada na tabela 5 também está sujeita à variação biológica natural. A variação técnica e de interpretação das linhas da célula de controle como avaliada pela hibridização in situ fluorescente também é reportada (18).

A avaliação do HER2 Control Slides deve ser considerada em todas as datas de validade relevantes. Armazene o Bond Oracle HER2 IHC System a 2–8 °C. Não congele. Volte a 2–8 °C imediatamente após o uso. Qualquer desvio dessas condições invalidarão o ensaio. Não substitua os reagentes do Bond Oracle HER2 IHC System por nenhum outro componente fornecido pela Leica Biosystems ou por outros fabricantes. Isso invalidará o ensaio.

É fundamental que todas as etapas descritas nas seções C até E (procedimento) sejam realizadas na sequência apresentada. Qualquer desvio desta sequência invalidará o ensaio.

No ensaio, é essencial usar apenas tecidos presos em fixadores baseados em formol. O uso de qualquer outro tipo de fixador invalidará o ensaio.

- O corte de secções de tecidos fora da faixa de espessura recomendada não será validado.
- O uso de qualquer outra espessura de secção pode invalidar o ensaio.

## Dados da linha da célula

Linha da célula	Perfil do Bond Oracle HER2 IHC System	Carga do receptor de HER2 por célula*	Status de amplificação do gene da HER2 <sup>+</sup>	
			Número da cópia do HER2	Índice do gene HER2:Chr17
SK-BR-3	3+	4,3x10 <sup>5</sup>	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4x10 <sup>5</sup>	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3x10 <sup>4</sup>	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3x10 <sup>3</sup>	3,15	1,13

\*Análise de carga do receptor de HER2 avaliada pela citometria de vazão. \*O status de amplificação do gene HER2 avaliado pela sonda dupla (HER2:Cromossomo 17) FISH.

Tabela 5. Perfil do HER2 Control Slide

## Concordância clínica do Bond Oracle HER2 IHC System vs. o Dako HercepTest

A primeira parte do estudo examinou a adequação do Bond Oracle HER2 IHC System para uso como um auxiliar na determinação do tratamento com terapia de Herceptin® (trastuzumab). O estudo foi designado para examinar a concordância entre o Bond Oracle HER2 IHC System e o Dako HercepTest, considerado o "padrão de ouro" para este ensaio. O critério de aceitação foi definido como concordância geral 75% maior entre os dois testes com 95% de intervalo de confiança (CI).

O estudo foi conduzido como uma avaliação cega em dois locais baseados nos EUA. A cada local de investigação, foram fornecidas amostras de câncer de mama embebido em parafina fixada com formol de status HER2 conhecido. Os casos foram selecionados em ordem consecutiva inversa dos arquivos clínicos, representando o fluxo consecutivo de casos em um departamento de histopatologia para testes clínicos e testados independentemente de outros prognósticos e/ou fatores preditivos sem tendências introduzidas ao coorte. Os coortes de 160 e 292 amostras foram testados no local 1 e no local 2, respectivamente. Cada coorte teve uma representação igual de casos ambíguos/positivos (2+, 3+) e negativos (0, 1+), baseados em classificações HER2 IHC previamente atribuídas, resultando em uma população total de estudo de 452 amostras. Doze (12) amostras foram consideradas inadequadas devido à falta de tumores invasivos suficientes e foram removidas do estudo. Nove (9) amostras extras não puderam ser classificadas por consequência do levantamento do tecido da lâmina, resultando em uma população final do estudo de 431 amostras.

Todos os casos tiveram a coloração feita com HercepTest de acordo com as instruções do fabricante conforme especificado na bula. As secções sequenciais de cada caso tiveram a coloração feita com Bond Oracle HER2 IHC System acoplado a um sistema de coloração avançado BOND da Leica Biosystems totalmente automatizado. Todos os casos foram desvinculados das informações de identificação de um paciente exclusivo e foram acompanhados por dados clínicos que relacionam o tamanho e a classe do tumor, bem como o status do receptor de estrógeno.

Todas as lâminas coloridas foram mascaradas e classificadas de maneira aleatória por observadores treinados nos dois locais. Para a análise de concordância 2x2, as classificações foram interpretadas como negativas se a intensidade de coloração foi de 0 ou 1+ e positivas

para classificações de 2+ ou 3+. Para a análise de concordância 3x3, as classificações foram interpretadas como negativas se a coloração foi de 0 ou 1+, ambíguas para classificações de 2+ e positivas para classificações 3+. Os dados foram analisados pelo acordo de coloração positiva e o acordo de coloração negativa.

## Resultados de concordância 2x2

Nesta primeira análise, o teste resulta de dois testes (Bond Oracle HER2 IHC System e Dako HercepTest) que foram classificados como negativo (0, 1+) ou positivo (2+, 3+). As frequências de quatro possíveis combinações são exibidas em uma tabela com formato 2x2 (veja a tabela 6). A taxa de concordância geral baseada nesta tabela 2x2 foi calculada acompanhada por um intervalo de confiança exato de 95% (baseada na distribuição binomial).

A hipótese nula ( $H_0$ ), contra a qual o critério de sucesso é definido, é que a concordância não seja maior que 75%.

O acordo observado para 431 amostras entre os dois testes em uma análise 2x2 mostra uma concordância de 92,34% (398/431) com um 95% de CI de 89,42% - 94,67%. Esse dados suportam a rejeição da hipótese nula ( $H_0$ ) de que o acordo não foi maior de 75% com valor  $p < 0,0001$ .

O percentual de acordo positivo (sensibilidade) ou a habilidade do Bond Oracle HER2 IHC System para identificar corretamente os casos positivos de HercepTest (o percentual de amostras classificadas positivas tanto pelo Bond Oracle HER2 IHC System quanto pelo HercepTest de todos os casos positivos de HercepTest) foi de 84,87% (129/152) com 95% de CI de 78,17%-90,16%. O percentual de acordo negativo (especificidade) ou a habilidade do teste para identificar corretamente os casos negativos de HercepTest (o percentual de amostras classificadas negativas tanto pelo Bond Oracle HER2 IHC System quanto pelo HercepTest de todos os casos negativos de HercepTest) foi de 96,42% (269/279) com 95% de CI de 93,51%-98,27%.

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

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

Tabela 6. Concordância 2x2 do Bond Oracle HER2 IHC System com HercepTest

## Resultados de concordância 3x3

Os dados foram agrupados como negativo (0 ou 1+), ambíguo (2+) ou positivo (3+) para análise 3x3 e mostraram uma concordância de 86,54% (373/431) com 95% de CI de 82,95% a 89,62%. Portanto, a hipótese nula ( $H_0$ ) de que o acordo não foi maior que 75% foi rejeitada com um valor  $p < 0,0001$ .

O percentual de acordo positivo de 3+ (o percentual de amostras classificadas positiva 3+ tanto pelo Bond Oracle HER2 IHC System quanto pelo HercepTest de todos os casos positivos 3+ do HercepTest) deste estudo foi de 73,33% (66/90) com 95% de CI de 62,97% a 82,11%. O percentual do acordo negativo foi de 96,42% (269/279) com 95% de CI de 93,51% para 98,27. Veja a tabela 7.

		HercepTest		
		Negativo (0 ou 1+)	2+	3+



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

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

Tabela 7. Concordância 3x3 do Bond Oracle HER2 IHC System com HercepTest

Concluindo, os dados gerados neste estudo demonstram que o Bond Oracle HER2 IHC System pode ser usado como um auxílio na determinação do tratamento para terapia de Herceptin® (trastuzumab), baseada em sua alta concordância com o HercepTest.

## Concordância clínica do Bond Oracle HER2 IHC System com o PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

A parte 2 do estudo pretendeu examinar a concordância entre o Bond Oracle HER2 IHC System e o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado o "padrão de ouro" para o ensaio de reflexo de avaliação de gene usado em conjunto com a imuno-histoquímica da HER2. Este estudo foi realizado nos mesmos locais de investigação do coorte do estudo da parte 1. Todos os casos tiveram a coloração feita com o Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit de acordo com as instruções do fabricante conforme especificado na bula. As secções sequenciais de cada caso tiveram a coloração feita com Bond Oracle HER2 IHC System acoplado a um sistema de coloração avançado BOND totalmente automatizado (mesmo usado na parte 1 do estudo clínico). Dos 431 casos, houve três ocasiões que não apresentaram resultados de coloração devido a hibridização insuficiente da sonda resultante em um coorte total de 428 casos.

Todas as lâminas coloridas foram classificadas por observadores treinados nos dois locais de investigação. Para a análise de concordância 3x2, as classificações foram interpretadas como negativas se a taxa de amplificação do gene HER2/CEP17 foi menor (<) que 2,0 e positivas se maior ou igual a (>) 2,0 seguindo uma contagem de 20 células de tumor.

### Resultados de concordância 3x2

O acordo observado para 428 amostras entre os dois testes em uma análise 3x2 mostra uma concordância de 87,6% (375/428) com 95% de CI de 84% a 90%.

O percentual de acordo positivo (sensibilidade) ou a habilidade do Bond Oracle HER2 IHC System para identificar corretamente os casos positivos de PathVysion (o percentual de amostras classificadas positivas tanto pelo Bond Oracle HER2 IHC System quanto pelo PathVysion de todos os casos positivos de PathVysion) foi de 93,8% (61+30/97) com 95% de CI de 86,8% a 97,4%.

O percentual de acordo negativo (especificidade) ou a habilidade do teste para identificar corretamente os casos negativos de PathVysion (o percentual de amostras classificadas negativas tanto pelo Bond Oracle HER2 IHC System quanto pelo PathVysion de todos os casos negativos de PathVysion) foi de 85,8% (284/331) com 95% de CI de 81,6% a 89,2%. Veja a tabela 8.

PathVysion HER-2 DNA Probe Kit
--------------------------------

		Negativo	Positivo	Totais
Bond Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	Totais	331	97	428

Concordância geral (95% CI) = 87,6% (84 a 90%)

Tabela 8. Concordância 3x2 da coloração do Bond Oracle HER2 IHC System vs. PathVysion HER-2 DNA Probe kit.

## Imunorreação – painel normal

Tipo de tecido normal	Padrão de coloração	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Supra-renal	Negativo	Negativo
Cérebro, cerebelo	Negativo	Negativo
Cérebro, encéfalo	Negativo	Negativo
Mama	Negativo	Negativo
Medula óssea	Negativo	Negativo
Cólon	Negativo	Negativo
Esôfago	Negativo	Negativo
Olho	Negativo	Negativo
Hipófise	Coloração citoplasmática moderada observada em células hipofisárias (1/3)	Negativo
Rim	Negativo	Negativo
Laringe	Negativo	Negativo
Fígado	Negativo	Negativo
Pulmão	Negativo	Negativo
Mesotélio	Negativo	Negativo
Ovário	Negativo	Negativo
Pâncreas	Negativo	Negativo
Paratireoide	Negativo	Negativo
Nervos periféricos	Negativo	Negativo
Próstata	Negativo	Negativo
Glândula salivar	Negativo	Negativo
Pele	Negativo	Negativo
Intestino delgado	Negativo	Negativo
Baço	Negativo	Negativo
Estômago	Coloração citoplasmática clara observada nas glândulas gástricas (2/3)	Negativo

Músculo estriado	Negativo	Negativo
Testículos	Negativo	Negativo
Timo	Negativo	Negativo
Tireoide	Negativo	Negativo
Amígdala	Negativo	Negativo
Colo uterino	Negativo	Negativo
Útero	Negativo	Negativo

Tabela 9. Coloração do painel normal

## Estudo sobre reprodutibilidade

### Teste de precisão interno e entre

O teste de precisão foi realizado na Leica Biosystems, Newcastle Ltd. O tecido usado foi uma micromatriz de tecido composto (TMA) embebido em parafina fixada com formol fornecido por Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seul, 120-752 Coreia), que compreende 20 núcleos de tecido de carcinoma de mama invasivo com 4 mm de diâmetro. Os 20 casos foram selecionados com base nas classificações da HER2 previamente atribuídas. Nesta base, foram incluídos x5 casos de HER2 3+, x5 casos de HER2 2+, x5 casos de HER2 1+ e x5 casos de HER2 0.

#### A. Teste de precisão de operação interna

O teste de precisão de operação interna dos Bond Oracle HER2 IHC Systems foi avaliado em um total de 40 seções consecutivas de um TMA composto de 20 tumores de mama invasivos e 40 HER2 Control Slides. Todas as lâminas tiveram a coloração feita com o Bond Oracle HER2 IHC System no sistema de coloração avançado BOND totalmente automatizado. As seções tiveram a coloração feita durante um período contínuo usando um Bond Oracle HER2 IHC System do mesmo lote de fabricação. As seções coloridas eram cegas e avaliadas de maneira aleatória por um observador experiente para determinar a precisão de operação interna.

Uma avaliação das lâminas a partir da investigação de operação interna indicou que 733/800 (91,63%) pontos de dados de teste puderam ser interpretados. 40 pontos de dados foram excluídos devido à presença de DCIS somente e 27 pontos de dados extras não puderam ser interpretados devido a uma perda do tumor invasivo (específico para 3 núcleos). A variação na coloração ocorreu 61 (8,32%) de um total de 733 eventos de coloração possíveis. Nas 37 ocasiões, a variação de 3+ a 2+ (n = 20) e de 1+ a 0 (n = 17) foi observada e, portanto, não representou uma mudança de clinicamente positivo para clinicamente negativo ou vice-versa em uma avaliação de dados 2x2. As 24 (3,27%) ocasiões restantes representaram uma mudança de clinicamente negativo (0 ou 1+) para clinicamente positivo (2+ ou 3+). Valor de aprovação = 96,7% (95% CI = 95,15% a 97,81%).

#### B. Teste de precisão entre operações

O teste de precisão entre operações do Bond Oracle HER2 IHC System foi avaliado em um total de 24 seções consecutivas de um TMA composto de 20 tumores de mama invasivos e 24 HER2 Control Slides. Todas as lâminas tiveram a coloração feita com o Bond Oracle HER2 IHC System no sistema de coloração avançado BOND totalmente automatizado. As lâminas foram avaliadas em 8 operações independentes, realizadas dentro do mesmo laboratório, em três ocasiões distintas, usando um Bond Oracle HER2 IHC System do mesmo lote de fabricação. As lâminas coloridas eram cegas e avaliadas de maneira aleatória por um único observador experiente para determinar a precisão de operação entre.

Uma avaliação das lâminas a partir da investigação entre operações indicou que 456/480

(95,00%) pontos de dados de teste puderam ser interpretados. Não foi possível interpretar 24 pontos de dados devido a uma perda do tumor invasivo (específico para 5 núcleos). A variação na coloração ocorreu 42 (9,21%) de um total de 456 pontos de dados. Nas 30 ocasiões, a variação de 3+ a 2+ (n = 10) e de 1+ a 0 (n = 20) foi observada e, portanto, não representou uma mudança de clinicamente positivo para clinicamente negativo ou vice-versa em uma avaliação de dados 2x2. As 12 (2,63%) restantes representaram uma mudança de clinicamente negativo (0 ou 1+) para clinicamente positivo (2+ ou 3+). Valor de aprovação = 97,37% (95% CI = 95,90% a 98,77%).

### C. Reprodutibilidade de lote a lote

Para determinar a reprodutibilidade lote a lote, 3 lotes dos Bond Oracle HER2 IHC Systems foram fabricados sob GMP em 3 ocasiões separadas em 24 secções de tumor de mama (24 pontos de dados de teste) de quatro diferentes blocos de tecido embebido em parafina fixada com formol (representando intensidades de 0, 1+, 2+ e 3+ de coloração da HER2) e três HER2 Control Slides (12 pontos de dados de controle). Três operações independentes foram realizadas dentro do mesmo laboratório em três ocasiões separadas, cada uma usando um lote de fabricação diferente do Bond Oracle HER2 IHC System. Todas as lâminas tiveram a coloração feita com o Bond Oracle HER2 IHC System incorporado no sistema de coloração avançado BOND totalmente automatizado. As lâminas coloridas eram mascaradas e avaliadas de maneira aleatória por um único observador experiente para determinar a reprodutibilidade lote a lote.

Uma avaliação das lâminas (testes e controles) a partir da investigação lote a lote indicou que 36/36 (%) pontos de dados de teste puderam ser interpretados. Não ocorreu nenhuma variação de coloração nos 36 pontos de dados entre os três diferentes lotes de fabricação do Bond Oracle HER2 IHC System. A coloração com o Bond Oracle HER2 IHC System é consistente em todos os lotes de fabricação.

### D. Reprodutibilidade entre laboratórios

O teste de reprodutibilidade entre laboratórios do Bond Oracle HER2 IHC System foi avaliado em 3 locais, Leica Biosystems Newcastle (local A) e dois laboratórios independentes (locais B e C) em um total de 192 secções de uma TMA composta de 20 tumores de mama invasivos e 24 HER2 Control Slides. Das 192 secções de TMA coloridas, 96 tiveram a coloração feita como o HER2 Primary Antibody e 96 com o reagente HER2 Negative Control. Todas as lâminas tiveram a coloração feita com o Bond Oracle HER2 IHC System no sistema de coloração avançado BOND totalmente automatizado. As lâminas foram avaliadas em 8 operações independentes, realizadas nos 3 locais de investigação diferentes usando um Bond Oracle HER2 IHC System do mesmo lote de fabricação. As lâminas coloridas eram cegas e avaliadas de maneira aleatória por um único observador experiente na Leica Biosystems, Newcastle para determinar a reprodutibilidade entre laboratórios.

Uma avaliação das lâminas a partir da reprodutibilidade entre laboratórios indicou que 1477/1920 (76,93%) pontos de dados de teste puderam ser interpretados. 443 pontos de dados de teste não puderam ser interpretados devido a:

- Desempenho inadequado da lâmina HER2 em 2/24 ocasiões resultando em 2 operações/160 pontos de dados de teste removidos. Este evento ocorreu uma vez no local A e uma vez no local B (80 pontos de teste de dados removidos por local de investigação).
- Desvio do plano de teste no local C, no qual um total de 24 lâminas foram contracoloridas manualmente com hematoxilina após a coloração Bond Oracle HER2 IHC System. Isto resultou em contracoloração excessiva tanto do HER2 control slides quanto dos pontos de dados de teste TMA que resultaram em 240 pontos de dados removidos.
- Perda de tumor invasivo resultando na remoção de 23 pontos de dados de teste. Este evento ocorreu em 23 ocasiões no local A e foi um resultado direto da perda de tecido no bloco de TMA na produção das 192 secções TMA consecutivas necessárias para concluir esta investigação.

d) Coloração incapaz de ser interpretada devido à lavagem inadequada pelo sistema de coloração avançada BOND totalmente automatizado resultando na remoção de 20 pontos de dados.

Uma avaliação das lâminas interpretáveis na investigação de precisão entre laboratórios indicou que a variação na coloração ocorreu em 79 (5,28%) dos 1477 eventos de coloração possíveis. Entre esses, 14/1477 (0,95%) ocasiões representaram variações de 0 a 1+ ou 2+ a 3+ e não representam uma mudança de clinicamente positivo para clinicamente negativo ou vice-versa em uma avaliação 2x2 de dados. Valor de aprovação = 99,05% (95% CI = 98,42% a 99,46%). Dos 14 eventos de coloração, 5/1477 (0,34%) ocorreram na Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (local A), 8/1477 (0,54%) ocorreram no local B e 1/1477 (0,07%) ocorreu no local C.

Os 65/1477 (4,40%) eventos de coloração restantes mostraram variações de 2+ a 1+ ou 2+ a 0 e, portanto, não representam uma mudança de clinicamente positivo para clinicamente negativo ou vice-versa em uma avaliação 2x2 de dados. Valor de aprovação = 95,6% (95% CI = 94,42% a 96,54%). Das 65 alterações clinicamente significativas, 11/65 (16,9%) ocorreram na Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (local A), 24/65 (36,9%) ocorreram no local B e 30/65 (46,1%) ocorreu no local C. Das mudanças clinicamente significativas, em nenhuma ocasião ocorreu uma alteração 3+ para um resultado negativo (0 ou 1+) ou vice-versa.

## E. Reprodutibilidade interobservadores

40 casos de câncer de mama invasivo selecionados aleatoriamente, fornecendo uma distribuição igual de cada uma das classes da HER2 IHC (amostras de re-seção), foram seccionadas de forma consecutiva e entregues para a Leica Biosystems, Newcastle (local A), local B e local C para coloração e interpretação. As seções eram cegas e aleatórias em cada local antes da classificação. O acordo interobservadores entre os dois locais clínicos independentes, local B e local C, foi de 87,5% (95% CI = 73,3% a 95,8%). O acordo entre os locais B e C e a Leica Biosystems Newcastle, Ltd foi 92,5% (95% CI = 79,6% a 98,4%) e 85% (95% CI = 70,1% a 94,29%) respectivamente. A análise da concorrência total entre os três observadores (A, B, C) é de 82,50%.

## F. Precisão entre instrumentos (BOND-MAX vs. BOND-III)

O teste de precisão entre instrumentos usando o Bond Oracle HER2 IHC System foi realizado em um único local de investigação europeu independente. As amostras testadas foram obtidas de seções inteiras embebidas em parafina fixada com formol de cento e trinta e oito (138) casos de câncer de mama invasivo (núcleo da agulha e amostras de re-seção). O teste entre aparelhos foi realizado prospectivamente dentro do local de investigação, seções consecutivas de coloração nas plataformas BOND-MAX e BOND-III. Os três (3) casos foram considerados inadequados devido à disponibilidade da amostra/tumor removida do estudo.

Os lotes com números idênticos de Bond Oracle HER2 IHC System e de reagentes auxiliares do aparelho BOND foram usados em cada aparelho. As seções foram coradas retrospectivamente. As lâminas foram interpretadas no local de investigação por um único observador experiente para determinar a precisão entre instrumentos.

Uma avaliação das lâminas provenientes da precisão entre aparelhos mostram uma concordância 2x2 entre positivo (2+, 3+) e negativo (0, 1+) de 94,2% (130/138) com um 95% CI de 88,9 a 97,5% e uma concordância 3x3 entre positivo (3+), ambíguo (2+) e negativo (0, 1+) de 87,0% (120/138) com 95% CI de 80,2 a 92,1%.

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

Concordância geral (95% CI) = 94,2% (88,9 a 97,5%)

Tabela 10. Concordância 2x2 da coloração do Bond Oracle HER2 IHC System nas plataformas BOND-MAX vs. BOND-III.

				BOND-MAX							
				Negativo (0/1+)		Ambíguo (2+)		Positivo (3+)		Totais	

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

Concordância geral (95% CI) = 87,0% (80,2 a 92,1%)

Tabela 11. Concordância 3x3 da coloração do Bond Oracle HER2 IHC System nas plataformas BOND-MAX vs. BOND-III.

Concluindo, os dados gerados neste estudo demonstram um alto nível de concordância entre os sistemas BOND-MAX e BOND-III da Leica Biosystems quando avaliados usando o Bond Oracle HER2 IHC System.

## Solução de problemas

Problema	Causa provável	Ação corretiva
Sem coloração imunohistoquímico	Operação interrompida antes da conclusão	Com o software BOND, confirme a presença de erros reportáveis durante a operação e a abordagem de coloração conforme orientado pelo software BOND.
	Seleção incorreta do protocolo	Certifique-se de que o padrão adequado para o *IHC Protocol H no campo de protocolo de coloração da caixa de diálogo Add slide.
	Desparafinação inadequada das lâminas	Certifique-se de que o modo *Dewax está selecionado no campo Preparation da caixa de diálogo Add slide.
	Quantidade incorreta de reagentes dispensados	Certifique-se de que todos os reagentes BOND foram alocados para os recipientes a granel e colocados nas posições adequadas no instrumento.
	Contaminação da BOND Wash Solution com azida sódica	Use BOND Wash Solution fresca preparada para a força de trabalho adequada.
Coloração clara imunohistoquímica específica	Recuperação inadequada do epítipo	Certifique-se de que os reagentes BOND Epítipo Retrieval adequados foram alocados nos recipientes a granel corretos e o software BOND foram padronizados com o protocolo de recuperação do epítipo adequado *HIER 25 min with *ER1 (97).
	Fixação incorreta ou processamento da amostra de teste	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste.
	Bond Oracle HER2 IHC System com data de validade vencida está sendo usado	Certifique-se de que o Bond Oracle HER2 IHC System usado esteja dentro de sua data de validade especificada.

Coloração imuno-histoquímica específica excessiva	Recuperação inadequada do epítopo	Certifique-se de que os reagentes BOND Epitope Retrieval adequados foram alocados nos recipientes a granel adequados e de que o software BOND foi padronizado como *HIER 25 min with ER1 (97).
	Varição na fixação	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste. Se possível, teste o estojo novamente usando outro bloco. Se não for possível, avalie as áreas que mostram melhores padrões de fixação neste conjunto com uma secção colorida H&E correspondente.
Problema	Causa provável	Ação corretiva



Coloração de fundo não específica	Quantidade incorreta de reagentes dispensados	Certifique-se de que todos os reagentes BOND foram alocados nos recipientes a granel e colocados nas posições adequadas no aparelho.
	Desparafinação inadequada das lâminas	Certifique-se de que o modo *Dewax está selecionado no campo Preparation da caixa de diálogo Add slide.
	Reação cruzada imuno-histoquímico não específica em tecido	Consulte a descrição do Bond Oracle HER2 IHC System da reação cruzada do tecido normal (consulte a tabela 9).
	Reação cruzada imuno-histoquímica não específica com áreas de necrose do tecido	Certifique-se de que a fixação baseada em formol é usada e que o cronograma de processamento é adequado para a amostra em teste. Se possível, teste o estojo novamente usando outro bloco. Se não for possível, avalie as áreas que mostram melhores padrões de fixação em conjunto com uma secção colorida H&E.
	Secagem artificial após a conclusão de uma operação de coloração	Se as amostras precisam ser colocadas em uma operação que levará a noite toda, recomenda-se usar a funcionalidade de início atrasado do BOND. Certifique-se de que há um volume adequado de água desionizada ou destilada disponível para despejar nas amostras durante este período para assegurar que as lâminas não sequem.
	Secções aderiram às lâminas com o auxílio de aditivos baseados em amido	Use lâminas sem amido (Leica BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040).
Tecido desconectado da(s) lâmina(s) de controle/paciente	Uso do tipo incorreto ou drenagem inadequado da secção	Certifique-se de que as lâminas corretas são usadas para as secções de controle/paciente (Leica BOND Plus Slides – cód. de produto S21.2113 ou Apex BOND Slides cód. de produto 3800040). Certifique-se de que as amostras receberam a drenagem adequada e estão encubadas por 12–18 horas a 37 °C (toda a noite). As secções que precisam de aderência extra podem ser incubadas a 60 °C por mais tempo.

Tabela 12. Bond Oracle HER2 IHC System Trouble Shooting Guide.

Se algum problema associado ao Bond Oracle HER2 IHC System estiver fora do escopo do guia de solução de problemas (consulte a tabela 12), entre em contato com o departamento ou distribuidor de serviços técnicos da Leica Biosystems para obter ajuda.

## Referências

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. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.

## Adições à edição anterior

Dados gástrica e código do produto adicional acrescentado.

## Data da edição

13 de Janeiro de 2020

## Identificação dos símbolos

	Código do lote		Armazenamento		Código de catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Fabricante		Frágil
	Consulte as instruções de uso		Contém suficiente para <n> testes		Use até AAAA-MM-DD
	Número de série				

HercepTest™ é uma marca comercial e sujeita às licenças mantidas pela DakoCytomation, Denmark A/S  
Herceptin® é uma marca comercial da Genentech, Inc. e F. Hoffmann-La Roche Ltd.