

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Használati útmutató

Leica Biosystems BOND™ teljesen automata, fejlett festőrendszerben való használatra.

Termékkód TA9145 60 tesztminta (150 metszet) megfestésére alkalmas:

60 tesztmetszet a következővel: HER2 Primary Antibody

60 tesztmetszet a következővel: HER2 Negative Control

15 HER2 Control Slides a következővel: HER2 Primary Antibody

15 pozitív saját ellenőrzőmetszet a következővel 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

Tartalom

A felhasználás célja	4
Összefoglaló és magyarázat	4
Háttér.....	4
A HER2 kifejeződése.....	5
Klinikai konkordancia – összefoglaló.....	5
Az eljárás alapjai	5
Biztosított összetevők.....	5
Használati útmutató.....	6
Tárolás és lejárát.....	6
A minta előkészítése.....	6
Figyelmeztetések és óvintézkedések.....	7
A beállítás menete	7
A. Nem biztosított reagensek	7
B. Nem biztosított felszerelés.....	7
C. Módszertan	8
D. Metszettelrendezés.....	8
E. Az eljárás lépései.....	9
Minőségellenőrzés	10
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	11
Saját pozitív ellenőrzőminta – HER2 Primary Antibody.....	12
Saját negatív ellenőrzőminta komponens – HER2 Primary Antibody.....	12
Betegből származó szövet – HER2 Negative Control	12
Betegből származó szövet – HER2 Primary Antibody	12
A vizsgálat hitelesítése.....	12
A festődés kiértékelése - emlő	12
A festődés kiértékelése - gyomor-bél rendszer	13
A metszetek szűrésének alapjai	14
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	14
2. Saját pozitív ellenőrzőminta – HER2 Primary Antibody.....	14
3. Saját negatív ellenőrzőminta – HER2 Positive Control	14
4. Betegből származó szövet – a következővel festve: HER2 Negative Control	14
5. Betegből származó szövet – a következővel festve: HER2 Primary Antibody	15
Korlátozások	15
A. Általános korlátozások	15
B. A termék speciális korlátozásai	15
Sejtvonal adatok	16
Klinikai konkordancia: Bond Oracle HER2 IHC System vs Dako HercepTest - Emlő	16
A 2x2-es konkordancia eredményei	17
A 3x3-as konkordancia eredményei	18
A Bond Oracle HER2 IHC System és a PathVysion HER-2 DNA Probe Kit klinikai konkordanciája - Emlő	18
A 3x2-es konkordancia eredményei	19
A Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti klinikai konkordancia - gyomor-bél rendszer	20
Eredmények - Bond Oracle HER2 IHC rendszer és Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest - gyomor-bél rendszer	20
A 2x2-es konkordancia eredményei	20
A 3x3-as konkordancia eredményei	21

Immunreaktivitás – normál panel.....	22
A vizsgálat megismételhetősége	23
Precíziós tesztelés alatt és között	23
A. A festésen belüli precizitás tesztelése.....	23
B. A festések közötti precizitás tesztelése.....	23
C. Tételenkénti reprodukálhatóság.....	23
D. Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság.....	24
E. Értékelők közötti reprodukálhatóság.....	24
F. Műszerek közötti pontosság (BOND-MAX vs BOND-III)	25
Hibaelhárítás	26
Referenciák	28

A felhasználás célja

In vitro diagnosztikai használatra

A Bond Oracle HER2 IHC rendszer egy fél-quantitatív immunhisztokémiai (IHC) vizsgálóeljárás, mely a HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) oncoprotein jelenlétét vizsgálja szövettani kiértékelésre előkészített emlőrákos szövet, illetve gyomor (beleértve a gastrooesophagealis átmenetet is) adenocarcinoma esetén. A Bond Oracle HER2 IHC System használata olyan beteget kiértékelésének támogatására indikált, akiknél Herceptin® (trastuzumab) kezelést terveznek (lásd a Herceptin® csomagolási címkéjét).

Megjegyzés: a Herceptin® klinikai vizsgálatra az összes beteget kutatási immun-citokémiai Clinical Trial Assay (CTA) használatával választották ki. Az ebben a kutatásban való részvételre kiválasztott betegek egyik sem használ Bond Oracle HER2 IHC System rendszert. A Bond Oracle HER2 IHC System rendszer egy független mintakészlet segítségével össze lett hasonlítva a Dako HercepTest™ teszttel, és a Klinikai konkordancia összefoglalóban jelzett elfogadható konkordancia eredményeket mutatta. A Bond Oracle HER2 IHC System rendszer és a klinikai kimenet közti aktuális korreláció még nem lett megállapítva.

A Herceptin® előrehaladott gyomorrák (ToGA) klinikai vizsgálat minden páciensét Dako HercepTest használatával választották ki. Az ebben a vizsgálatban való részvételre kiválasztott betegek egyike sem használ Bond Oracle HER2 IHC rendszert. A Bond Oracle HER2 IHC rendszert egy független mintakészleten hasonlították össze a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitesttel, és elfogadható konkordanciaszintű eredményt kaptak, mely a Klinikai konkordancia – összefoglalóban (gyomor-bél rendszer) is szerepel. A Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a klinikai kimenet közti aktuális korrelációt még nem állapították meg.

Összefoglaló és magyarázat

Háttér

A Bond Oracle HER2 IHC System rendszer egérből származó monoklonális anti-HER2 antitestet, clone CB11-et tartalmaz. A Clone CB11, melyet eredetileg a Corbett et al (1) fejlesztett ki és a Novocastra Laboratories Ltd (jelenleg Leica Biosystems Newcastle Ltd) gyárt, a HER2 daganatfehérje belső doménjéhez kapcsolódik.

Olyan arányban, az emlő és a gyomor rákos betegek, a HER2 onkoprotein overexpresszáljuk részeként a folyamat malignus transzformáció és a tumor progresszióját (2). HER2 állapot azt is kimutatták, hogy fontos következményei kezelésére gyomorrák (3). Overexpression A HER2 onkoprotein talált emlőrákos sejtekre utal, HER2, mint a cél egy ellenanyag-alapú terápia, míg abból a ToGA kísérlet világosan jelzi, hogy a használata Herceptin® a gyomorrák a kemoterápia mellett a hatékony kezelés, amely javítja a teljes túlélés HER2 pozitív gyomorrák kialakulása (4). Herceptin® egy humanizált monoklonális ellenanyag (5), amely nagy affinitással kötődik a HER2 onkoprotein, és kimutatták, hogy gátolja a proliferációt eredményez tumorsejtek fokozottan expresszálta a HER2 onkoprotein in vitro és in vivo (6-8).

A Nakane és Pierce (9) által bevezetett első immunperoxidáz technika óta számos fejlesztő lépett be az immun-hisztokémia területére, és ennek nyomán megnőtt a technikák érzékenysége. A legújabb fejlesztések a polimer címkézést használják fel. Ez a technológia mind elsődleges antitesteken, mind immun-hisztokémiai észlelőrendszereken alkalmazható (10). A Bond Oracle HER2 IHC System által használt Compact Polymer™ észlelőrendszer egy új, irányított polimerizációs technológia család része, melyet kifejezetten polimerizált, HRP-hez kötött antitest konjugátumok előkészítésére fejlesztettek ki. Mivel az Oracle termékpaletta ezt a polimerizációs technológiát használja, így a streptavidin/biotin észlelőrendszerekben látható nem specifikus endogén biotin festődés nem lép fel.

A HER2 kifejeződése HER2

A HER2 daganatfehérje immun-hisztokémiai módszerekkel észlelhető szinten fejeződik ki a különböző elhelyezkedésű adenokarcinómák kb. 20 százalékában. 10% és 20% az invazív ductalis carcinómák a mell (11) és 20% a gyomor rákos megbetegedések (12-14) pozitív a HER2-onkoprotein. A comedo típusú in situ ductális karcinómák (DCIS) 90%-a pozitív (15), valamint szinte az összes, emlőre lokalizálódó Paget-kóros eset pozitív (16).

Klinikai konkordancia – összefoglaló

A Bond Oracle HER2 IHC System a Herceptin® klinikai vizsgálatokban használt kutatási Clinical Trial Assay (CTA) alternatívájaként került kifejlesztésre. Független vizsgálatban értékelték ki a Bond Oracle HER2 IHC System teljesítményét a HER2 daganatfehérje fokozott expressziójának meghatározásában, melynek során a Bond Oracle HER2 IHC System eredményeit a Dako HercepTest eredményeivel hasonlították össze az Egyesült Államokból származó 431 emlőtumor mintán. Ezen daganatminták egyike sem származott olyan betegből, aki a Herceptin® klinikai vizsgálatban részt vett. Az eredmény szerint a két vizsgálat eredményei közti konkordancia 92,34% a 2x2-es analízisben (95% konfidenciaintervallum: 89,42% – 94,67%) és 86,54% a 3x3-as analízisben (95% konfidenciaintervallum: 82,95% – 89,62%).

Független vizsgálatban kiértékelték a Bond Oracle HER2 IHC rendszer teljesítményét a gyomorból (beleértve a gastrooesophagealis átmenetet is) származó adenocarcinómák HER2 oncoproteinjének fokozott expressziója kapcsán, melyben a Bond Oracle HER2 IHC rendszer eredményeit Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitesttel hasonlították össze 287 kínai eredetű gyomordaganat-mintán. Ezen daganatminták egyike sem származott olyan betegből, aki a Herceptin® klinikai vizsgálatban részt vett. Az eredmény szerint a Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) eredményei közti konkordancia 95,12% a 2x2-es analízisben (95% konfidenciaintervallum: 91,95 - 97,31%) és 89,90% a 3x3-as analízisben (95% konfidenciaintervallum: 85,81 - 93,13).

Az eljárás alapjai

A Bond Oracle HER2 IHC System tartalmazza a formalinnal fixált, paraffin beágyazású szövetek immun-hisztokémiai festéséhez szükséges összetevőket. Az előkészített HER2 Primary Antibody (clone CB11) antitesttel való inkubálás után a rendszer azonnali használhatóságú Compact Polymer technológiát alkalmaz. Az ezután hozzáadott kromogén anyag enzimátikus átalakítása után az antigénoldalán látható reakciótermék keletkezik. A szövettani metszeteken utószínezés, dehidráció, tisztítás és fixálás lehet szükséges. Az eredmények fénymikroszkópiával értékelendők ki. A festési sor validálására ellenőrzőmetszetek állnak rendelkezésre négy, formalinnal fixált, paraffin beágyazású humán emlőrák sejtvonalal. A négy sejtvonal 0, 1+, 2+ és 3+ intenzitású HER2 daganatfehérje kifejeződést mutat be. Ezen sejtvonalak festődésének intenzitása arányos mind a HER2 daganatfehérje sejtenkénti receptorszámával, mind a HER2 génamplifikációs állapottal.

A Bond Oracle HER2 IHC System (termékkód: TA9145) a Leica Biosystems BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerben való használatra való.

Biztosított összetevők

Az alábbi anyagok (1. táblázat) 150 metszet megfestésére elegendőek (60 tesztmetszet inkubálva a következővel: HER2 Primary Antibody, 60 egyező tesztmetszet inkubálva a következővel: HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slide inkubálva a következővel: HER2 Primary Antibody, és 15 saját pozitív ellenőrzőmetszet inkubálva a következővel: HER2 Primary Antibody). A tesztek száma a metszetenkénti 150 µl-es automata adagoláson alapul. A készlet tartalma maximum 15 egyedi BOND festési sor elvégzésére elegendő.

HER2 Control Slides, (x15)	Formalinnal fixált, paraffin beágyazású humán emlőrák sejtvonalai metszetek, melyek a megadott protokoll szerinti festés esetén a HER2 daganatfehérje kifejeződését 0, 1+, 2+ és 3+ festődési intenzitással mutatják be. A metszetek teljesen rögzítve vannak és nem igényelnek további szárítást.
HER2 Primary Antibody, 13,5 ml	Használatra kész, affinitás szerint tisztított, egér monoklonális IgG-antitestet, clone CB11 sejtvonalat, és 0,35% ProClin [™] 950-t tartalmaz.
HER2 Negative Control, 9 ml	Használatra kész egér monoklonális IgG-antitestet (a HER2 Primary Antibody antitesthez képest ekvivalens koncentrációban) és 0,35% ProClin [™] 950-et tartalmaz.
Peroxide Block, 22,5 ml	3–4% hidrogén-peroxidot tartalmaz.
Post Primary, 22,5 ml	Nyúlból származó egér elleni IgG-antitestet (<10 µg/ml) tartalmaz 10%-os (v/v) állati szérumot tartalmazó Tris-pufferoldatban, valamint 0,09% ProClin [™] 950-et.
Polymer, 22,5 ml	Kecskéből származó poli-HRP nyúl elleni IgG-antitestet (<25 µg/ml) tartalmaz 10%-os (v/v) állati szérumot tartalmazó Tris-pufferoldatban, valamint 0,09% ProClin [™] 950-et.
DAB Part 1, 2,25 ml	66 mM 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidrokloridot tartalmaz stabilizátor oldatban.
DAB Part B (x2), 22,5 ml	≤0,1% (v/v) hidrogén-peroxidot tartalmaz.
Hematoxylin, 22,5 ml	<0,1% hematoxilint tartalmaz.

1. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC System összetevői

Használati útmutató

Minden mellékelt reagens speciálisan ehhez a vizsgálathoz lett kialakítva, a tételszámok pedig minden egyes Bond Oracle HER2 IHC System esetén egyediek. Helyettesítések esetén a vizsgálat nem hiteles.

Tárolás és lejárati

Tárolás 2–8 °C-on. Ne fagyassa le. Használat után azonnal vissza kell helyezni a 2–8 °C-os hőmérsékletre. Az ettől való eltérés esetén a vizsgálat nem hiteles. Ügyeljen rá, hogy a Bond Oracle HER2 IHC System csak a lejárati dátumon belül legyen felhasználva. A Bond Oracle HER2 IHC System szennyeződésére vagy instabilitására utaló jelek a következők: az oldat zavarosodása, szag megjelenése, csapadékképződés. A fentiektől eltérő tárolási körülményeket a felhasználónak kell ellenőrizni.

A minta előkészítése

Minden mintát úgy kell előkészíteni, hogy a szövet az immun-hisztokémiai festés számára megőrződjön. Minden minta esetén a szokásos szövetfeldolgozási eljárásokat kell használni (17). Javasoljuk, hogy ezeket a szöveteket formalin alapú fixálóval készítsék elő, majd a rutin feldolgozás után ágyazzák be paraffinba. A kivágott metszetekből például 3–4 mm vastag blokkokat kell képezni, majd 18–24 órán át 10% semleges-pufferelt formalinban kell fixálni. A szöveteket alkoholsorral dehidrálni kell, majd xilennel tisztítani, végül maximum 60 °C-on tartva olvasztott paraffinba kell ágyazni. A szövetmintákból 3–5 µm-es metszeteket kell készíteni.

A HER2 daganatfehérje kiértékeléséhez és a daganat igazolásához szükséges metszeteket egyszerre kell előkészíteni. Az antigenitás megőrzése érdekében a tárgylemezre (Leica BOND Plus Slides, termékkód: S21.2113 vagy Apex BOND Slides termékkód: 3800040) rögzített szövetszöveteket a metszést követő 4–6 héten belül meg kell festeni, ha szobahőmérsékleten (18–24 °C) voltak tartva. A metszést követően javasolt a metszetek 12–18 óras (egy éjszakányi) inkubálása 37 °C-on. Az erősebb tapadást igénylő metszetek esetén további egy órán át 60 °C-on inkubálás javasolt.

Az Egyesült Államokban az 1988-as Clinical Laboratory Improvement Act (klinikai laboratóriumokra vonatkozó kutatási törvény) 42 CFR 493.1259(b) része megköveteli, hogy „a laboratóriumok a megfestett metszeteket legalább a vizsgálat dátumát követő 10 évig, a szövetblokkokat pedig legalább a vizsgálat dátumát követő 2 évig megőrizték”.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Kizárólag szakember általi felhasználásra.

A termék veszélyes összetevőket tartalmaz.

Alapvető előírás, hogy 18 évnél fiatalabb személy ezzel a termékkel nem dolgozhat. A felhasználóknak részletesen el kell magyarázni a munka menetét, a termék veszélyes jellemzőit, valamint a szükséges biztonsági utasításokat.

Az Oracle reagensben használt tartósítószernek, a ProClin™ 950-nek való túlzott kitettség tünetei a bőr és a szem, illetve a nyálkahártyák és a felső légutak irritációja. A ProClin™ 950 ebben a termékben maximum 0,35%-os koncentrációban van jelen. Ez az oldat nem éri el a veszélyes anyagokra vonatkozó OSHA-kritériumokban megadott határértéket. Az anyagbiztonsági adatlapot kérésre rendelkezésre bocsátjuk, valamint elérhető a www.LeicaBiosystems.com honlapon is.

A mintákat (mind rögzítés előtt, mind utána) és a mintákkal érintkező anyagokat potenciálisan fertőzések átvitelére képes anyagokként kell kezelni, és a megfelelő rendszabályok betartása mellett kell őket ártalmatlanítani.

Tilos a reagens szájjal történő pipettázása! A reagens és minták bőrrel vagy nyálkahártyával való érintkezését el kell kerülni. Ha reagens vagy minta érzékeny területtel kerül érintkezésbe, az érintett területet bő vízzel le kell mosni. Ilyen esetben forduljon orvoshoz. A potenciálisan mérgező összetevők ártalmatlanításával kapcsolatban forduljon az állami vagy helyi szabályozószervekhez.

A reagens mikrobiológiai szennyeződését minimalizálni kell, ellenkező esetben megnő a nem specifikus festődések száma.

A beállítás menete

A. Nem biztosított reagens

- BOND Dewax Solution (termékkód: AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (termékkód: AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (termékkód: AR9590)
- Szokványos immun-hisztokémiai oldatok (pl. etilalkohol – abszolút és fokszámozott)
- Xylene (vagy xilen helyettesítők)
- Rögzítő közeg
- Desztillált vagy ionmentesített víz

B. Nem biztosított felszerelés

- Leica Biosystems' BOND-MAX és BOND-III teljesen automata, fejlett festőrendszer
- BOND Universal Covertiles™ (termékkód: S21.2001, S21.4583 vagy S21.4611)
- BOND Mixing Stations (termékkód: S21.1971)
- Szárító, 60 °C tartására alkalmas

- Fénymikroszkóp, (4–40x-es nagyítású objektív)
- Tárgylemezek (Leica BOND Plus Slides, termékkód: S21.2113 vagy Apex BOND Slides termékkód: 3800040)
- Fedőlapok
- BOND Slide Label & Print Ribbon (termékkód: S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (termékkód: CS9100)

C. Módszertan


- A módszertanba való belekezdés előtt a felhasználónak el kell sajátítania a BOND teljesen automatizált immun-hisztokémiai technikákat.
- Minden tesztmetszethez, melyet a HER2 Primary Antibody segítségével festenek meg, tartoznia kell egy azonos metszetnek a HER2 Negative Control festéshez. A negatív ellenőrzőmetszet lehetővé teszi a differenciálást az antigénhely specifikus és nem specifikus festődése között. Minden egyes BOND festési sornak tartalmaznia kell egy HER2 Control Slide-ot. Ha a festési protokoll végén a sejtvonalak nem mutatják a helyes festődési mintát (lásd a Bond Oracle HER2 IHC System értelmezési útmutatóját), akkor a festési sor érvénytelennek nyilvánítandó.

D. Metszettelrendezés

Minden metszetenél az új BOND Universal Covertile fedőlemez használata (termékkód: S21.2001, S21.4583 vagy S21.4611) javasolt. Korábban immun-hisztokémiai vagy in situ hibridizációs festésnél alkalmazott BOND Universal Covertiles használata ezzel a teszttel nincs hitelesítve.

A metszettartó tálcá elrendezése (2. táblázat) biztosítja a Bond Oracle HER2 IHC System optimális teljesítményét, és mind a 60 teszt elvégzését.

Metszet pozíciója	Metszet leírása	Reagens	Szövet típusa	Metszet ikonja
1	1. tartó	*HER2 Negative Control	Teszt	
2	2. tartó	*HER2 Negative Control	Teszt	
3	3. tartó	*HER2 Negative Control	Teszt	
4	4. tartó	*HER2 Negative Control	Teszt	
5	1. tartó	*HER2PrimaryAntibody	Teszt	
6	2. tartó	*HER2PrimaryAntibody	Teszt	
7	3. tartó	*HER2PrimaryAntibody	Teszt	
8	4. tartó	*HER2PrimaryAntibody	Teszt	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Pozitív	

10	Saját ellenőrzőmetszet	*HER2PrimaryAntibody	Pozitív	
----	------------------------	----------------------	---------	--

2. táblázat A metszettartó tálcá elrendezése, a szövetek típusával és a reagensekkel

E. Az eljárás lépései

Az alábbi lépéseket követve állítsa be a metszettartó tálcát a 2. táblázatnak megfelelő elrendezésbe. Ezeket az utasításokat a BOND rendszer felhasználói kézikönyvével együtt kell olvasni.

- Ellenőrizze a BOND berendezésben, hogy az ömlesztett és veszélyes anyagokat tartalmazó tartályokban elegendő hely legyen a szükséges mennyiségű festési sor megfestéséhez.
- Ellenőrizze, hogy a szükséges számú festési sorhoz elegendő etil-alkohol, desztillált vagy ionmentesített víz, BOND Dewax Solution (használatra készen szállítva), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (használatra készen szállítva) és BOND Wash Solution (x10-es töménységben szállítva) álljon rendelkezésre a tömeges reagenstartályokban.
- Ellenőrizze, hogy tiszta BOND Mixing Station legyen beszerelve.
- Kapcsolja be a BOND teljesen automata, fejlett festőrendszert.
- Kapcsolja be a BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerhez csatlakoztatott BOND gépezérlőt.
- Indítsa el a BOND programot.
- Új Bond Oracle HER2 IHC System esetén olvassa le a reagenstálca vonalkódját a kéziszkennelvel, hogy a rendszert bevigye a BOND reagenstkönyvtárba.
- Menjen a Metszetbeállítás képernyőre, és kattintson az Add case (**tartó hozzáadása**) elemre.
- Adja meg az első tartó adatait. Ellenőrizze, hogy az adagolási térfogat 150 µl legyen, és előkészítési protokollnak *Dewax legyen kiválasztva. Kattintson az OK gombra.
- A Slide setup (metszetbeállítás) képernyőn válassza ki a tartót, majd kattintson az Add slide (**metszet hozzáadása**) elemre.
- Elsőként adjon hozzá betegből származó tesztmetszeteket. A szövet típusa Test tissue (**teszt szövet**) kell legyen.
- Ellenőrizze, hogy az adagolási térfogat 150 µl legyen, és előkészítési protokollnak *Dewax legyen kiválasztva.
- A festési módnál válassza ki az Single (**egyszeres**) és az Oracle értéket (ne kattintson az Oracle control lehetőségre).
- Válassza ki az IHC eljárást.
- Válassza ki a *HER2 Negative Control (HER2 negatív kontroll) lehetőséget a markerlistából. A Protokollok fülön állítsa alapértelmezésre a megfelelő festési protokollt (*IHC Protocol H) és a HIER protokollt (*HIER 25 perc ER1 (97)-tel).
- Kattintson az Add slide (**metszet hozzáadása**) elemre. A reagenshez létrejön a negatív ellenőrzőmetszet.
- Az Add slide (metszet hozzáadása) panelen válassza ki a *HER2 Primary Antibody lehetőséget a markerlistából. Az alapértelmezett protokoll és a többi beállítás változatlan marad.
- Kattintson az Add slide (**metszet hozzáadása**) elemre. Létrejön a tesztmetszet.
- Ismételje addig a 8–18. lépéseket, míg minden tartó és betegből származó tesztmetszet létre nem jön.
- Ezután hozza létre a HER2 Control Slide-ot. A szokásos laboratóriumi gyakorlattól függően

adja hozzá az utolsó tartóhoz vagy hozzon létre egy új tartót az ellenőrzőmetszeteknek.

Fontos tudnivaló: a vizsgálat hitelesítésének feltétele, hogy a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben egy HER2 Control Slide el legyen helyezve minden egyes festési sorban (azaz minden metszettartó tálcán).

21. A Metszet hozzáadása panelen állítsa a szövet típusát Positive tissue **(pozitív szövet)** lehetőségre.
22. Kattintson az Oracle control **(Oracle ellenőrzőminta)** lehetőségre.
23. Válassza ki a HER2 Control Slide tételszámát a Lot No **(tételszám)** listából. A tételszám a metszet címke részére van gravírozva.

Fontos tudnivaló: a HER2 Control Slide ugyanabból a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerből kell származzon, amelyet használni fog.
24. Válassza ki a *HER2 Primary Antibody lehetőséget a markerlistából. Hagyja a beállított értéken az adagolási térfogatot, a festési módot, az eljárást és a protokollt.
25. Kattintson az Add slide **(metszet hozzáadása)** lehetőségre a HER2 Control Slide hozzáadásához.
26. Végül adjon hozzá egy saját pozitív szövettani ellenőrzőmetszetet.
27. Törölje az Oracle control **(Oracle ellenőrzőminta)** kijelölését.
28. Válassza ki a *HER2 Primary Antibody lehetőséget a markerlistából. Hagyja a beállított értéken az adagolási térfogatot, a festési módot, az eljárást és a protokollt. A szövet típusa maradjon Positive tissue **(pozitív szövet)**.
29. Kattintson az Add slide **(metszet hozzáadása)** elemre. Ezzel a metszetek létrehozása befejeződött.
30. Nyomtassa ki a metszetcímkeket. Minden Oracle metszetcímkére rá van nyomva az „OC” megjelölés. A HER2 Control Slide-on a Bond Oracle HER2 IHC System tételszám is szerepel.
31. Címkezza fel megfelelően a metszeteket.
32. Nyissa fel a Bond Oracle HER2 IHC System tartályok fedeleit, és töltsé be a reagenseket a BOND egységbe.
33. Tegye be a metszeteket a metszettartó tálcába a 2. táblázat D szakaszában látható módon. Helyezzen fel új fedőlemezeket.
34. Töltsé be a tálcákat a BOND egységbe, és nyomja meg a Load/Unload **(betöltés/kiadás)** gombot.
35. Ellenőrizze, hogy a metszetek be vannak-e olvasva, majd nyomja meg a Run (Play) **(futtatás (indítás))** gombot a System status (rendszerállapot) képernyőn.
36. Ellenőrizze, hogy a tálcajelző mezőben a Proc (OK) **(Feld. (OK))** szöveg jelenik-e meg, és látható-e a tételszám és a befejezési idő.
37. A futtatás végén nyomja meg a Load/Unload **(betöltés/kiadás)** gombot, majd vegye ki a tálcákat a BOND egységből.
38. Vegye le a fedeleket, majd öblítse le a metszeteket ionmentesített vízzel.
39. Szárítsa ki, tisztítsa meg és rögzítse a metszeteket.

Minőségellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában a szövetek fixálási, feldolgozási és beágyazási különbségei az eredmények szignifikáns eltéréseikhez vezethetnek, emiatt a Leica Biosystems Bond Oracle HER2 IHC System rendszeréhez szállított HER2 Control Slides mellett a teljesítmény rendszeres saját ellenőrzése is szükséges. A minőségellenőrzési irányelveket az Amerikai Patológiai Kollégium (College of American Pathologists, CAP) Immun-hisztokémiai tanúsítvány programjában találja meg. Lásd még: CLSI (korábbi NCCLS) Immun-hisztokémiai minőségbiztosítás, Jóváhagyott irányelv (17) és Speciális jelentés: Immun-hisztokémiai minőségellenőrzés (18). Emellett az alábbi, 3. táblázat is tartalmazza az immun-hisztokémiai minőségellenőrzés típusait és céljait.

Minta*	Leírás	HER2 Primary Antibody Festés	HER2 Negative Control festés
HER2 Control Slide	A Bond Oracle HER2 IHC System rendszerhez szállított módon.	Ellenőrzi a festési eljárást, és validálja a reagens teljesítményét.	
Saját pozitív ellenőrzőminta	A cél antigént tartalmazó szövet. Az ideális ellenőrző enyhén pozitívan festődő szövet, így az elsődleges antitest érzékenysége nyelhe változásai is észlelhetők.	Az analízis minden lépését ellenőrzi. Validálja a szövet előkészítést, és a Bond Oracle HER2 IHC System festés teljesítményét.	A nem specifikus háttérfestődés észlelése
Saját negatív ellenőrzőminta	Negatívnak várt szövetek vagy sejtek (elhelyezkedhet betegből származó szövetben vagy pozitív/negatív ellenőrzőmintában).	A sejtekkel/sejtalkotókkal történő nonspecifikus antitest keresztreakciók észleléséhez.	

*Betegből származó mintaként fixálva és feldolgozva

3. táblázat Immun-hisztokémiai minőségellenőrzés és ennek céljai

Az ellenőrzőmintákat biopsziával vagy sebészi úton kell kinyerni, majd a beteg mintáihoz hasonlóan a lehető leghamarabb formalinban kell fixálni, végül feldolgozás után paraffinba kell ágyazni. Minden mintát úgy kell előkészíteni, hogy a szövet antigenicitása az immun-hisztokémiai festés számára megőrződjön. Minden minta esetén a szokásos szövetfeldolgozási eljárásokat kell használni (17).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Minden mellékelt HER2 Control Slide-ot négy, formalinnal fixált, paraffin beágyazású humán emlőrák sejtvonalat tartalmaz, melyek festődése 0, 1+, 2+ és 3+ intenzitású. Minden tesztfestéshez egy metszetet kell hozzáadni (azaz tálcánként). A Leica Biosystems HER2 Control Slide-jának helyes kiértékelése jelzi a teszt validitását (lásd a Bond Oracle HER2 IHC System értelmezési útmutatót). Az ezzel a rendszerrel szállított HER2 Control Slides kizárólag a reagens teljesítményét hitelesíti, a szövettani minta előkészítését nem.

Saját pozitív ellenőrzőminta – HER2 Primary Antibody

Ha saját pozitív ellenőrzőmintákat használ, úgy ezeket biopsziával vagy sebészi úton kell kinyerni, és a beteg mintáihoz hasonlóan a lehető leghamarabb fixálni kell, majd feldolgozás után be kell ágyazni. A pozitív ellenőrzőminták a szövetek helyes előkészítését jelzik és a festési technikát validálják. Minden festési sorban legalább egy pozitív ellenőrzőmintát el kell helyezni. A pozitív ellenőrzőmetszet gyenge pozitív festődést kell mutasson, így az elsődleges antitest érzékenysége nyelhe változásai és észlelhetők.

Megjegyzés: az ismerten pozitív összetevők kizárólag a feldolgozott szövetek és a tesztreagensek

megfelelő együttes teljesítményét jelzik, és NEM használhatók fel a betegből származó minták értelmezéséhez segítségként. Ha a pozitív ellenőrzőminta nem mutat kellően pozitív festődést, úgy a betegből származó minta eredménye érvénytelennek nyilvánítandó.

Megfelelő saját ellenőrzőanyag lehet egy olyan, több szövetből álló blokk, amely mind a 4 HER2 fokozatot képviselő tumort tartalmaz.

Saját negatív ellenőrzőminta – HER2 Primary Antibody

Ha saját negatív ellenőrzőmintákat használ, úgy ezeket frissen, biopsziával vagy sebészi úton kell kinyerni, és a beteg mintáihoz hasonlóan a lehető leghamarabb fixálni kell, majd feldolgozás után be kell ágyazni. Minden egyes festésnél használjon a HER2 daganatfehérje ismerten negatív ellenőrzőmintát az elsődleges antitest specifitásának ellenőrzésére, és az esetleges nem specifikus háttérfestődés megjelenítésére. A legtöbb szövetmetszetben jelen lévő különféle sejttípusok nagy száma belső negatív ellenőrzőhelyeket kínál (ezeket a felhasználónak kell hitelesíteni). A tumorról összefüggésbe nem hozható, normál emlőjáratok felhasználhatók a vizsgálat hitelesítésére. Ha a negatív ellenőrzőmintában specifikus festődés történik, úgy a betegből származó minta eredménye érvénytelennek nyilvánítandó.

Megfelelő pozitív és negatív ellenőrzőanyag lehet egy olyan, több szövetből álló blokk, amely mind a négy HER2 fokozatot képviselő tumort tartalmaz.

Betegből származó szövetminta – HER2 Negative Control

Használja a mellékelt HER2 Negative Control mintát a HER2 Primary Antibody helyett a megfelelő metszetenél minden egyes beteg tesztmintájánál a nem specifikus festődés kiértékelésére, és a specifikus HER2 daganatfehérje festődésének pontos értelmezésére az antigénhelyen.

Betegből származó szövetminta – HER2 Primary Antibody

A pozitív festődés intenzitását a HER2 Negative Control nem specifikus háttérfestődésével összefüggésben kell értékelni. A többi immun-hisztokémiai teszthez hasonlóan a negatív eredmény itt sem azt jelenti, hogy a vizsgált szövetben/sejtben nincs antigén, csak azt, nincs észlelve. A Bond Oracle HER2 IHC System immunreaktivására vonatkozó speciális információkat lásd: A metszetek szűrésének alapjai, korlátozásai, a teljesítmény értékelése és az immunreaktivitás c. részt.

A vizsgálat hitelesítése

Mielőtt a felhasználó a diagnosztikai eljárásban bármely antitesttel vagy festőrendszerrel munkába kezdene, az antitestek specifitását ellenőrizni kell egy sorozat olyan saját szövetmintán, melyek ismert immun-hisztokémiai pozitív és negatív profillal rendelkeznek. Lásd az előzőleg ismertetett Minőségellenőrzés részt, valamint a CAP Immun-hisztokémiai tanúsítvány program és/vagy a CLSI (korábbi NCCLS) Immun-hisztokémiai minőségbiztosítás, Jóváhagyott irányelv (17) követelményeit. Ezeket a minőségellenőrzési eljárásokat minden új antitest tételnél, illetve a vizsgálati paraméterek bármiféle módosítása esetén meg kell ismételni. A vizsgálat hitelesítéséhez ismert festődésű, 0–3+ besorolású HER2 daganatfehérjét expresszázó invazív (infiltráló) humán dukális emlőkarcinóma, valamint más, megfelelő negatív szövetminta alkalmas.

A festődés kiértékelése - Emlő

A HER2 daganatfehérje expressziójának meghatározásához csak a membránfestődési mintázat és intenzitás értékelhető ki a 4. táblázatban szereplő skála alapján. A metszetek kiértékelését világos-látóteres mikroszkópot használó patológus kell végezze. Az immun-hisztokémiai festés kiértékeléséhez és a besoroláshoz 10x-es nagyítású objektív megfelelő. 20–40x-es nagyítású objektív a besorolás megerősítéséhez használandó. A citoplazma festődését nem specifikus festődésnek kell értékelni, és nem számítható bele a sejtmembrán festődési intenzitásának értékelésébe (19). A 0, 1+, 2+, és 3+ festődési fokozatok közti különbségtételhez segítségként

lásd a Bond Oracle HER2 IHC System értelmezési útmutatóban található képeket a festődési intenzitásról. Csak invazív emlőkarcinómás betegek mintái értékelhetők. Ha ugyanazon mintában *in situ* karcinóma és invazív karcinóma is előfordul, csak az invazív rész értékelhető ki.

Immun-hisztokémiai festődési mintázat	Fokozat	Értékelés
Nem vagy csak a daganatsejtek kevesebb, mint 10%-ban észlelhető membránfestődés.	0	Negatív
A daganatsejtek több, mint 10%-ban észlelhető gyenge/enyhe membránfestődés. A sejtmembránok csak részben festődnek.	1+	Negatív
A daganatsejtek több, mint 10%-ban észlelhető gyenge-közepes membránfestődés a teljes sejtmembránon.	2+	Bizonytalan (gyenge pozitív)
A daganatsejtek több, mint 10%-ban észlelhető erős membránfestődés a teljes sejtmembránon.	3+	Erős pozitív

4. táblázat. A HER2 festődés kiértékelése

Bond Oracle HER2 IHC System festődési eredménye 0 és 1+ besorolás esetén a HER2 daganatfehérje expressziójára nézve negatívnak értékelendő, bizonytalanak (gyenge pozitívnak) számít a 2+, és erős pozitívnak a 3+ besorolás. Bond Oracle HER2 IHC System nem biztosít diagnosztikai információt a beteg és/vagy az orvos számára, és ilyen célú használatra nincs hitelesítve. A metszeteket minden egyes festődési kiértékelésnél az alábbi módon kell megvizsgálni a festődés validálásához és a szövetszövet minták festődési intenzitása szemikvantitatív kiértékelésének az engedélyezéséhez.

A festődés kiértékelése - gyomor-bél rendszer

A HER2 oncoprotein expressziójának meghatározásához csak a membránfestődési mintázat és intenzitás értékelhető ki az 5. és 6. táblázatban szereplő skála alapján. A metszetek kiértékelését világos-látóteres mikroszkópot használó patológus végezze. Az immun-hisztokémiai festés kiértékeléséhez és a besoroláshoz 10x-es nagyítású objektív megfelelő. 20–40x-es nagyítású objektív a besorolás megerősítéséhez használandó. A citoplazma festődését nem specifikus festődésnek kell értékelni, és nem számítható bele a sejtmembrán festődési intenzitásának értékelésébe (15). A 0, 1+, 2+, és 3HER2 + festődési fokozatok közti különbségtételhez segítségként lásd a Bond Oracle HER2 IHC rendszer gyomor-bél rendszeri értelmezési útmutatóban található képeket a festődési intenzitásról. Csak a gyomor vagy a gastrooesophagealis átmenet adenocarcinómájával rendelkező betegek mintái értékelhetők.

	Immun-hisztokémiai festődési mintázat	Fokozat	Értékelés
Sebészeti minták	Nem vagy csak a daganatsejtek kevesebb, mint 10 %-ában észlelhető membránfestődés.	0	Negatív
	Adaganatsejtek több, mint 10 %-ában észlelhető gyenge/enyhe membránfestődés. A sejtmembránok csak részben festődnek.	1+	Negatív
	A daganatsejtek 10 %-ában, illetve ennél nagyobb részében észlelhető gyenge-közepes membránfestődés a teljes, a bazolaterális vagy a laterális sejtmembránon.	2+	Bizonytalan (gyenge pozitív)
	A daganatsejtek több, mint 10 %-ában észlelhető erős membránfestődés a teljes, a bazolaterális vagy a laterális sejtmembránon.	3+	Erős pozitív

5. táblázat. A HER2 festődés értelmezése gyomor eredetű sebészeti mintákon

	Immun-hisztokémiai festődési mintázat	Fokozat	Értékelés
Biopsziás minták	Nem észlelhető festődés egyetlen daganatsejtben sem	0	Negatív
	Daganatsejt csoportokban gyenge/enyhe membránfestődés észlelhető, a megfestődött sejtek százalékos arányától függetlenül	1+	Negatív
	Daganatsejt csoportokban gyenge-közepes membránfestődés észlelhető a teljes, a bazolaterális vagy a laterális sejtmembránon, a megfestődött sejtek százalékos arányától függetlenül	2+	Bizonytalan (gyenge pozitív)
	Daganatsejt csoportokban erős membránfestődés észlelhető a teljes, a bazolaterális vagy a laterális sejtmembránon, a megfestődött sejtek százalékos arányától függetlenül	3+	Erős pozitív

6. táblázat. A HER2 festődés értelmezése gyomor eredetű biopsziás mintákon

A Bond Oracle HER2 IHC rendszerrel festett biopsziás minták értelmezésére legalább 5 daganatsejtből álló csoport használata javasolt.

A metszetek szűrésének alapjai

A metszetek szűrése az alábbi sorrendben kell történjen:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Az Oracle HER2 Control Slide-dal végzett valid vizsgálatra az alábbiak jellemzők:

- Erős barna, teljes membránfestődés a 3+ SK-BR-3 ellenőrző sejtvonalban.
- Gyenge vagy közepes barna, teljes membránfestődés a 2+ MDA-MB-453 ellenőrző sejtvonalban.

- Enyhe vagy gyenge barna, részleges membránfestődés az 1+ MDA-MB-175 ellenőrző sejtvonalban.
- Nincs festődés a 0 MDA-MB-231 ellenőrző sejtvonalban.

Fontos tudnivaló: az MDA-MB-175 1+ ellenőrző sejtvonal megjelenése kivehető növekedési mintázatot mutat, ahol a sejtek halmazokba tömörülnek. Ez a halmaz folyamatos lumináris kefeszegély régiót képez a sejthalmaz szélén. Ennek a kefeszegélynek a festődése erősebb, mint máshol a sejtmembránoké. A korrekt HER2 daganatfehérje 1+ festődési mintázataiban enyhe vagy gyenge barna, részleges membránfestődés szerepel. A sejtplazma Golgi-készülékeinek pontszerű immunfestése szintén megfigyelhető ebben a sejtvonalban.

2. Saját pozitív ellenőrzőminta – HER2 Primary Antibody

A kiválasztott pozitív mintában jelenlévő HER2 daganatfehérje állapotának megfelelő barna membránfestődés kell MEGFIGYELHETŐ legyen.

3. Saját negatív ellenőrzőminta – HER2 Positive Control

A membránfestődés HIÁNYA kell megfigyelhető legyen. A negatív ellenőrzőminta megerősíti az észlelőrendszer keresztreakciójának a hiányát a megcélzott sejtekkel/sejtösszetevőkkel. Ha a negatív ellenőrzőmintában membránfestődés történik, úgy a betegből származó minta eredménye érvénytelennek nyilvánítandó.

4. Betegből származó szövet – a következővel festve: HER2 Negative Control

A membránfestődés HIÁNYA megerősíti a megcélzott antigén speciális címkézését az elsődleges antitesttel. Ha a HER2 Negative Control mintával együtt kezelt minták sejtplazmájában más barna festődés is észlelhető (pl. kötőszövet, leukociták, eritrociták vagy sejttörmelék), akkor az nem specifikus festődésnek értékelendő és figyelembe veendő.

5. Betegből származó szövet – a következővel festve: HER2 Primary Antibody

HER2 daganatfehérje expressziós szintjeit a 4-6. táblázatban és a Bond Oracle HER2 IHC System értékelési útmutatóban szereplő kritériumok alapján kell kiértékelni.

Korlátozások

A. Általános korlátozások

Az immun-hisztokémia egy többlépcsős laboratóriumi technika, melyet a hisztopatológiai jellemzők értelmezésének és meghatározásának a támogatására használnak. A technika speciális gyakorlatot igényel az eljárás minden szakaszában (ideértve a megfelelő reagensek és szövetek kiválasztását, a fixálást, a feldolgozást, és az immun-hisztokémiai metszet előkészítését is) és az értelmezésben is.

A szövetek immun-hisztokémiai festődése erősen függ a szövetek festés előtti kezelésétől, fixálásától és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, felolvasztás, lemosás, szárítás, melegítés, metszés, illetve a más szövetekkel vagy folyadékokkal való szennyeződés műtermékeket, antitest-árnyékolást vagy álnegatív eredményeket hoz létre. Az eltérő eredmények a fixálási és beágyazási eljárások különbségeire, illetve a szövetek belső szabálytalanságaira vezethetők vissza (21). Az excesszív vagy hiányos utófestődés szintén meghamisíthatja az eredmények helyes értelmezését.

Amennyiben előfordul, a nem specifikus festődés rendszerint diffúz megjelenésű. A kötőszövet szórványos festődése is megfigyelhető a formalinban túl hosszán fixált szövetek esetén. A festődési eredmények értékeléséhez csak ép sejteket válasszon. A nekrotikus vagy degeneratív sejtek gyakran aszpecifikusan festődnek (22). Az álpozitív eredmények időnként a fehérjék nem immunológiai kötődése vagy a szubsztrát reakciótermékei miatt láthatók. A használt immun-hisztokémiai festéstől függően okozhatják emellett endogén enzimek is, például a pszeudoperoxidáz (eritrociták) vagy az endogén peroxidáz (citokróm C).

Hepatitis B vírussal fertőzött betegből származó és hepatitis B vírus felületi antigénnel (HBsAg) szennyezett szövetek esetén a nem specifikus festődést torna peroxidázzal lehet

kizárni (23).

A nem várt immun-hisztokémiai festődés vagy a festődés variabilitása a kódoló gének vagy antigének eltérő szintű kifejeződése miatt is lehet. A várt festődési mintázat bármely megváltozását más diagnosztikai vizsgálatokkal együtt kell értékelni.

Az immun-hisztokémiai festés eredményeit morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő ellenőrzőanyaggal kell kiegészíteni, valamint a beteg klinikai előzményeinek és egy gyakorlott patológus által elvégzett egyéb diagnosztikai teszteknek a figyelembe vételével kell értékelni.

A vizsgálat teljesítményét (azaz mind a pozitív, mind a negatív kontroll megfeleléségének kiértékelését) és bármely immun-hisztokémiai festődés értelmezését (vagy a festődés hiányát) egy megfelelően akkreditált/jogosított laboratóriumban, kellően képzett és tapasztalt patológus felügyelete alatt kell elvégezni, aki az immun-hisztokémiai vizsgálat teljes kiértékeléséért és értelmezéséért a felelősséget viseli.

B. A termék speciális korlátozásai

Ez a termék áramlási citometriával nem használható. A teljesítmény karakterisztikája áramlási citometria esetén meghatározva.

A szövettani metszetben az antigének lebomlása miatt álnegatív eredmény is látható lehet. A HER2 daganatfehérje kiértékeléséhez és a daganat igazolásához szükséges metszeteket egyszerre kell előkészíteni. Az antigenitás megőrzése érdekében a szövetmintákat tartalmazó tárgylemezeket (Leica BOND Plus Slides, termékkód: S21.2113 vagy Apex BOND Slides termékkód: 3800040) a metszést követő 4–6 héten belül meg kell festeni, ha szobahőmérsékleten (18–24 °C) voltak tartva. A metszést követően javasolt a metszetek 12–18 órás inkubálása 37 °C-on. Az erősebb tapadást igénylő metszetek esetén további egy órán át 60 °C-on inkubálás javasolt.

A növesztett sejtcsoportokban az immun-hisztokémiai profil minimális természetes változatossága figyelhető meg a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben. Ezek a természetes változatok jóval a biológiai létformák elfogadható tűréshatárán belül vannak, és nem befolyásolják a rendszer teljesítményének megítélését.

A sejtvonalak 7. táblázatban szereplő, áramlási citometriával és in situ hibridizációval nyert jellemzőire szintén vonatkozik a biológiai változatosság. Az ellenőrző sejtvonalak technikai és értelmezési változatai fluoescens in situ hibridizációval szintén megfigyelhetők voltak (24).

A HER2 Control Slides értékelését a megfelelő lejáratú dátumra ügyelve kell elvégezni. A Bond Oracle HER2 IHC System tárolása 2–8 °C-on történjen. Ne fagyassza le. Használat után azonnal vissza kell helyezni a 2–8 °C-os hőmérsékletre. Az ettől való eltérés esetén a vizsgálat nem hiteles.

Ne cserélje ki a Bond Oracle HER2 IHC System reagenseket sem a Leica Biosystems, sem más gyártó reagenseivel. Ellenkező esetben a vizsgálat nem lesz hiteles.

Alapvető fontosságú, hogy a C – E szakaszokban ismertetett lépések mindegyikét a megadott sorrendben végezzék el. Az ettől a sorrendtől való eltérés esetén a vizsgálat nem hiteles.

Kiemelten fontos, hogy ebben a vizsgálatban csak formalin alapú fixálóval fixált szövetek használhatók fel. Más típusú fixálók használata a vizsgálatot érvénytelenné teszi.

A javasolt metszetvastagsági tartományon kívül eső szövettani metszetek nem hitelesíthetők. Eltérő vastagságú metszetek használata a vizsgálatot érvénytelenné teheti.

Sejtvonal adatok

Sejtvonal	BOND Oracle HER2 IHC System profil	HER2sejtenkénti receptorszám*	HER2 génamplifikációs állapot [†]	
			HER2 másolatszám	HER2:Chr17 génarány
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

*A HER2 receptorszám meghatározása áramlási citometriával mérve. [†]A HER2 génamplifikációs állapot kettős próbával értékelve (HER2:17-es kromoszóma) FISH.

7. táblázat HER2 Control Slide profil

Klinikai konkordancia: Bond Oracle HER2 IHC System vs Dako HercepTest - Emlő

A vizsgálat egy része a Bond Oracle HER2 IHC System használhatóságát vizsgálta a Herceptin® (trastuzumab) kezelés támogatásában. A vizsgálat úgy lett kialakítva, hogy meghatározza a Bond Oracle HER2 IHC System és a Dako HercepTest közti konkordanciát, mely utóbbi az elemzés viszonyítási alapja is. Elfogadási kritériumként a két teszt közti 75%-nál magasabb fokú konkordancia van megjelölve, 95%-os konfidenciaintervallum (CI) mellett.

A vizsgálatot két, egyesült államokbeli helyszínen, vakértékeléssel végezték el. Minden vizsgálóhely ismert HER2 állapotú, formalinnal fixált, paraffin beágyazású emlőrák mintával lett ellátva. Az esetek a klinikai archívumokból fordított sorrendben lettek kiválasztva, ami az eseteknek a szövettani osztályra, klinikai tesztesésre való egymás után beérkezését hivatott leképezni. A mintákat más prognosztikai és/vagy prediktív tényezőktől függetlenül tesztelték, ahol a kohorsz nem mutatott eltérést. Az 1. és 2. helyen 160, illetve 292 mintából álló kohorsz vizsgálata történt. Minden kohorszban egyenlően reprezentálódott a bizonytalan/pozitív (2+, 3+) és a negatív (0, 1+) esetek száma (a korábban megállapított HER2 IHC besorolás alapján), így a teljes vizsgálati populáció 452 mintából állt. 12 minta nem bizonyult megfelelőnek, mivel nem tartalmazott kellően infiltratív tumort, így ezek a vizsgálatból eltávolításra kerültek. További 9 mintát a szövetnek a felületről való elválása miatt nem lehetett besorolni, így a vizsgálat végleges populációszáma 431 minta volt.

Minden mintát HercepTest használatával, a gyártó által a csomagoláson megadott módon festettek meg. Minden mintából egymás utáni metszeteket festettek meg a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerrel a Leica Biosystems BOND teljesen automatizált, fejlett festőrendszerrel használatával. Minden mintáról eltávolították az egyedi azonosítókat, majd a tumor méretére, stádiumára, besorolására és az ösztrogén-receptor állapotára utaló klinikai információkkal látták el.

Minden festett metszet randomizált módon képzett vizsgálók által lett maszkolva és értékelve a két helyen. A 2x2-es konkordancia analízishez az értékelés során negatívnak lett értékelve a 0 és 1+, míg pozitívnak a 2+ vagy 3+ intenzitás. A 3x3-as konkordancia analízishez az értékelés során negatívnak lett értékelve a 0 és 1+, bizonytalanak a 2+, míg pozitívnak a 3+ intenzitás. Az adatok ezáltal a negatív és pozitív festődési egyezés szerint lettek elemezve.

A 2x2-es konkordancia eredményei

Ebben az elsődleges analízisben a két teszt (Bond Oracle HER2 IHC System és Dako HercepTest) eredményei negatív (0,1+) és pozitív (2+, 3+) csoportba sorolódtak. A négy lehetséges kombináció gyakorisága 2x2-táblázatként van megjelenítve (lásd: 8. táblázat). Ezután ezen 2x2-es táblázat alapján lett kiszámítva az átlagos konkordancia hányad 95%-os

konfidenciaintervallum mellett (binomiális eloszlás alapján).

A sikerfeltétellel szembeállított nullhipotézis (H_0) szerint a konkordancia nem nagyobb, mint 75%. A 2x2-es analízisben a két teszt között megfigyelt egyezés a 431 mintában 92,34%-os (398/431) konkordanciát mutatott 95%-os CI (89,42% – 94,67%) mellett. Ezen adatok alapján elvetésre került a nullhipotézis (H_0), mely szerint az egyezés nem nagyobb, mint 75% (p -érték < 0,0001).

A pozitív egyezés (érzékenység) aránya vagy a Bond Oracle HER2 IHC System képessége a HercepTest pozitív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC System és HercepTest által pozitívnak minősített minták számának aránya az összes HercepTest pozitív esethez képest) 84,87% (129/152) volt 95%-os CI (78,17%–90,16%) mellett. A negatív egyezés (specifitás) aránya vagy a teszt képessége a HercepTest negatív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC System és HercepTest által negatívnak minősített minták számának aránya az összes HercepTest negatív esethez képest) 96,42% (269/279) volt 95%-os CI (93,51%–98,27%) mellett.

		HercepTest		
		Negatív	Pozitív	Összesen
Bond Oracle HER2 IHC System	Negatív	269	23	292
	Pozitív	10	129	139
	Összesen	279	152	431

2x2-es konkordancia (95% CI) = 92,34% (89,42 – 94,67%); $p < 0,0001$

8. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC System és HercepTest 2x2-es konkordanciája

A 3x3-as konkordancia eredményei

A 3x3-as analízisben az adatok negatív (0 vagy 1+), bizonytalan (2+) és pozitív (3+) csoportokba sorolódtak, és 86,54%-os konkordanciát mutattak (373/431) 95%-os CI mellett (82,95% – 89,62%). Ezek alapján elvetésre került a nullhipotézis (H_0), mely szerint az egyezés nem nagyobb, mint 75% (p -érték < 0,0001).

A pozitív 3+ egyezés aránya (a Bond Oracle HER2 IHC System és a HercepTest által 3+ pozitívnak minősített minták számának aránya az összes HercepTest pozitív esethez képest) ebben a vizsgálatban 73,33% (66/90) volt 95%-os CI mellett (62,97% – 82,11%). A negatív egyezés aránya 96,42% (269/279) volt 95%-os CI mellett (93,51% – 98,27%). Lásd a 9. táblázatot.

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

3x3-as konkordancia (95% CI) = 86,54% (82,95 – 89,62%); $p < 0,0001$

Következésképpen az ebből a vizsgálatból nyert adatok bemutatták, hogy a Bond Oracle HER2 IHC System HercepTest teszteredményével való nagyfokú konkordanciája miatt alkalmas a Herceptin® (trastuzumab) kezelés támogatására.

Klinikai konkordancia: Bond Oracle HER2 IHC System vs PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Emlő

A vizsgálat 2. fázisa a Bond Oracle HER2 IHC System és az Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit közti konkordancia vizsgálatára irányult, ahol ez utóbbi volt a génkiértékelési reflexvizsgálat vonatkoztatási pontja a HER2 immun-hisztokémia során.

A vizsgálat az 1. fázissal azonos vizsgálóhelyeken és azonos kohorszokon történt. Minden mintát az Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit használatával, a gyártó által a csomagoláson megadott módon festettek meg. Minden mintából egymás utáni metszeteket festettek meg a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerrel a BOND teljesen automatizált, fejlett festőrendszere használatával (a klinikai vizsgálat 1. fázisából). A 431 festett mintából három esetben nem volt értékelhető eredmény kinyerhető a minta elégtelen hibridizációja miatt, így a kohorsz összesen 428 esetet tartalmazott.

Minden festett metszetet képzett vizsgálók értékelték a két helyen. A 3x2-es konkordancia analízishez az értékelés negatívnak tekintendő, ha a HER2/CEP17 génamplifikációs arány 20 daganatsejt számlálása esetén kisebb mint (<) 2,0, és pozitívnak, ha nagyobb vagy egyenlő, mint (>) 2,0.

A 3x2-es konkordancia eredményei

A 3x2-es analízisben a két teszt között megfigyelt egyezés a 428 mintában 87,6%-os (375/428) konkordanciát mutatott 95%-os CI (84% – 90%) mellett.

A pozitív egyezés (érzékenység) aránya vagy a Bond Oracle HER2 IHC System képessége a PathVysion pozitív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC System és PathVysion által pozitívnak minősített minták számának aránya az összes PathVysionpozitív esethez képest) 93,8% (61+30/97) volt 95%-os CI (86,8% – 97,4%) mellett.

A negatív egyezés (specifitás) aránya vagy a teszt képessége a PathVysion negatív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC System és PathVysion által negatívnak minősített minták számának aránya az összes PathVysionnegatív esethez képest) 85,8% (284/331) volt 95%-os CI (81,6% – 89,2%) mellett. Lásd a 10. táblázatot.

		PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negatív	Pozitív	Összesen
BOND Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	Összesen	331	97	428

Átlagos konkordancia (95% CI) = 87,6% (84,1 – 90,6%)

10. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC System festődés és a PathVysion HER-2 DNA Probe Kit 3x2-es konkordanciája.

A Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti klinikai konkordancia - gyomor-bél rendszer

A vizsgálat 3. szakaszának a célja adatok nyerése volt formalinnal fixált, paraffin beágyazású előrehaladott gyomorrákmintákból, hogy megvizsgálja a Bond teljesen automata, fejlett festőrendszert használó Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti konkordanciát. A harmadik szakasz elfogadási feltételeként a két teszt közti 75%-nál magasabb összekordanciát határozták meg.

A 2x2-es konkordancia analízishez az értékelés során negatívnak lett értékelve a 0 és 1+, míg pozitívnak a 2+ vagy 3+ intenzitás. A 3x3-as konkordancia analízishez az értékelés során negatívnak lett értékelve a 0 és 1+, bizonytalanak a 2+, míg pozitívnak a 3+ intenzitás. Az adatokat ezután a negatív és pozitív festődési egyezés szerint elemezték.

Eredmények - Bond Oracle HER2 IHC rendszer és Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest - gyomor-bél rendszer

A 2x2-es konkordancia eredményei

A Bond teljesen automata, fejlett festőrendszert használó Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti konkordancia vizsgálata 287 mintán történt.

A két teszt közti konkordancia 2x2-es elemzés esetén 95,12% (273/287) volt 95%-os CI (91,95-97,31%) mellett. Ezen adatok alapján elvetésre került a nullhipotézis (H_0), mely szerint az egyezés nem nagyobb, mint 75% (p -érték<0,0001). A pozitív egyezés (érzékenység) aránya vagy a Bond Oracle HER2 IHC rendszer képessége a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) által pozitívnak minősített minták számának aránya az összes Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitív esethez képest) 90,79% (138/152) volt 95%-os CI (85,03-94,87%) mellett. A negatív egyezés (specifitás) aránya vagy a teszt

képessége a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatív esetek (a Bond Oracle HER2 IHC System és a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) által negatívnak minősített minták számának aránya az összes Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatív esethez képest) megfelelő azonosítására 100 % (135/135) volt 95%-os CI (97,30-100 %) mellett (lásd: 11. táblázat).

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)		
		Negatív	Pozitív	Összesen
Bond Oracle HER2 IHC rendszer	Negatív	135	14	149
	Pozitív	0	138	138
	Összesen	135	152	287

Átlagos konkordancia (95 % CI) = 95,12 % (91,95-97,31 %)

11. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC rendszerrel való festés és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti 2x2-es konkordancia gyomorszövetben.

A 3x3-as konkordancia eredményei

A két teszt közti konkordancia 3x3-as elemzés esetén 89,90 % (258/287) volt 95 %-os CI (85,81-93,13 %) mellett. Ezek alapján elvetésre került a nullhipotézis (H_0), mely szerint az egyezés nem nagyobb, mint 75 % (p -érték < 0,0001). A pozitív 3+ egyezés aránya vagy a Bond Oracle HER2 IHC rendszer képessége a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) pozitív esetek megfelelő azonosítására (a Bond Oracle HER2 IHC rendszer és a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) által 3+ pozitívnak minősített minták számának aránya az összes Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) 3+ pozitív esethez képest) ebben a vizsgálatban 85,94 % (110/128) volt 95 %-os CI (78,69-91,45 %) mellett. A negatív egyezés (specifitás) aránya vagy a teszt képessége a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatív esetek (a Bond Oracle HER2 IHC System és a Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) által negatívnak minősített minták

számának aránya az összes Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) negatív esethez képest megfelelő azonosítására 100 % (135/135) volt 95%-os CI (97,30-100%) mellett. Lásd a 12. táblázatot.

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)			
		Negatív (0 vagy 1+)	2+	3+	Összesen
Bond Oracle HER2 IHC rendszer	Negatív (0 vagy 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	Összesen	135	24	128	287

Átlagos konkordancia (95% CI) = 89,90% (85,81-93,13%)

12. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC rendszerrel való festés és a Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nyúlból származó monoklonális elsődleges antitest közti 3x3-as konkordancia gyomorszövetben.

Immunreaktivitás – normál panel

Normál szöveti típus	Festődési minta	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Mellékvese	Negatív	Negatív
Agy, kisagy	Negatív	Negatív
Agy, nagyagy	Negatív	Negatív
Emlő	Negatív	Negatív
Csontvelő	Negatív	Negatív
Vastagbél	Negatív	Negatív
Nyelőcső	Negatív	Negatív
Szem	Negatív	Negatív
Hipofízis	Közepescitoplazma-festődésáthatóahipofízis sejtekben (1/3)	Negatív
Vese	Negatív	Negatív
Gége	Negatív	Negatív
Máj	Negatív	Negatív
Tüdő	Negatív	Negatív
Mesothelium	Negatív	Negatív
Petefészek	Negatív	Negatív
Hasnyálmirigy	Negatív	Negatív
Mellékpajzsmirigy	Negatív	Negatív
Perifériás idegek	Negatív	Negatív

Prosztata	Negatív	Negatív
Nyálmirigy	Negatív	Negatív
Bőr	Negatív	Negatív
Vékonybél	Negatív	Negatív
Lép	Negatív	Negatív
Gyomor	Gyenge citoplazma-festődés látható a gyomormirigyekben (2/3)	Negatív
Harántcsíkolt izom	Negatív	Negatív
Here	Negatív	Negatív
Csecsemőmirigy	Negatív	Negatív
Pajzsmirigy	Negatív	Negatív
Mandula	Negatív	Negatív
Méhnyak	Negatív	Negatív
Méh	Negatív	Negatív

13. táblázat Normál festődési panel

A vizsgálat megismételhetősége

Precíziós tesztelés alatt és között

A precíziós tesztelést a Leica Biosystems, Newcastle Ltd végezte. A felhasznált szövet formalin fixálású, paraffin beágyazású kompozit szöveti microarray (tissue micro array, TMA) minta volt, melyet az Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea) bocsátott rendelkezésre; és amely 20, egyenként 4 mm átmérőjű invazív emlőrák szövethengert tartalmazott. A 20 eset az előzőleg megjelölt HER2 besorolás alapján lett kiválasztva. Ebben, x5 HER2 3+, x5 HER2 2+, x5 HER2 1+ és x5 HER2 0 besorolású minta volt megtalálható.

A. A festésen belüli precizitás tesztelése

A Bond Oracle HER2 IHC System festésen belüli precizitásának tesztelése egy 20 invazív emlőrák mintát tartalmazó TMA-ból származó egymást követő 40 metszet és 40 HER2 Control Slide kiértékelésével történt. Minden metszetet a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerrel festettek meg. A metszetek egyetlen folyamatos időszak alatt, azonos gyártási tételből származó Bond Oracle HER2 IHC System rendszerrel lettek megfestve. A festett metszeteken maszkolás után randomizált értékelést végeztek egy tapasztalt vizsgáló segítségével az egyetlen festésen belüli precizitás meghatározására.

A festésen belüli reprodukálhatósági vizsgálat metszeteinek értékelése alapján 733/800 (91,63%) tesztelési mintahely volt értékelhető. 40 mintahely ki lett zárva, mivel csak DCIS volt jelen, további 27 mintahely pedig az invazív tumor elvesztése miatt nem volt értékelhető (3 minta esetén). A lehetséges 733 festődésnél festődési variáció 61 (8,32%) esetben történt. 37 esetben 3+ helyett 2+ (n = 20) és 1+ helyett 0 (n = 17) volt megfigyelhető, ami emiatt nem jelentett a klinikai pozitív és negatív értékelések közti váltást a 2x2-es értékelésben. A maradék 24 (3,27%) eset klinikailag negatívról (0 vagy 1+) klinikailag pozitívrá (2+ vagy 3+) váltást képvisel. Siker aránya = 96,7% (95% CI = 95,15% – 97,81%).

B. A festések közötti precizitás tesztelése

A Bond Oracle HER2 IHC System festések közötti precizitás tesztelése egy 20 invazív emlőrák mintát tartalmazó TMA-ból származó egymást követő 24 metszet és 24 HER2 Control Slide-ot kiértékelésével történt. Minden metszetet a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerrel festettek meg. A metszeteket 8 független festődési teljesítmény alapján értékelték, ahol ugyanaz a laboratórium 3 különböző alkalommal azonos gyártási tételből származó Bond Oracle HER2 IHC System rendszert használt. A festett

metszeteken maszkolás után randomizált értékelést végeztek egy tapasztalt vizsgáló segítségével a festések közötti precizitás meghatározására.

A festések közötti precizitási vizsgálat metszeteinek értékelése alapján 456/480 (95,00%) tesztelési mintahely volt értékelhető. 24 mintahely nem volt értékelhető az invazív tumor elvesztése miatt (5 minta esetén). A lehetséges 456 festődésnél festődési variáció 42 (9,21%) esetben történt. 30 esetben 3+ helyett 2+ (n = 10) és 1+ helyett 0 (n = 20) volt megfigyelhető, ami emiatt nem jelentett a klinikai pozitív és negatív értékelések közti váltást a 2x2-es értékelésben. A maradék 12 (2,63%) eset klinikailag negatívról (0 vagy 1+) klinikailag pozitívrá (2+ vagy 3+) váltást képvisel. Siker aránya = 97,37% (95% CI = 95,90% – 98,77%).

C. Tételenkénti reprodukálhatóság

A tételenkénti reprodukálhatóság meghatározásához 3 tétel Bond Oracle HER2 IHC System lett legyártva GMP szerint 3 különböző alkalommal, és 24 emlőrák metszetet (24 tesztelési mintahelyet) vettek ki 4 különböző, formalinnal fixált, paraffin beágyazású szövetblokkból (melyek HER2 0, 1+, 2+ és 3+ besorolási intenzitásokat képviseltek), és ezeket 3 HER2 Control Slide-dal (12 ellenőrző mintahelyet) együtt értékelték ki. Három független festést végeztek ugyanabban a laboratóriumban három eltérő alkalommal, mindegyik esetén eltérő Bond Oracle HER2 IHC System gyártási tételt használva. Minden metszetet a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerrel festettek meg. A festett metszeteken maszkolás után randomizált értékelést végeztek egy képzett vizsgáló segítségével a tételenkénti reprodukálhatóság meghatározására.

A tételenkénti vizsgálat metszeteinek (tesztek és ellenőrzőmetszetek) értékelése alapján 36/36 mintahely volt értékelhető. A 36 mintahelyen nem fordult elő festődési eltérés a három különböző Bond Oracle HER2 IHC System gyártási tétel között. A BOND Oracle HER2 IHC System használatával végzett festés a gyártási tételektől függetlenül egységes.

D. Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

A Bond Oracle HER2 IHC System laboratóriumok közti reprodukálhatóság vizsgálata 3 vizsgálóhelyen (Leica Biosystems Newcastle Ltd (A vizsgálóhely), és 2 független laboratóriumban (B és C vizsgálóhely) történt összesen 192 metszeten, melyek 20 invazív emlőrákos mintát tartalmazó TMA-ból származtak, valamint 24 HER2 Control Slide-on. A 192 festett TMA metszetről 96 volt a HER2 Primary Antibody és 96 a HER2 Negative Control reagenssel festve. Minden metszetet a Bond Oracle HER2 IHC System-ben BOND teljesen automata, fejlett festőrendszerrel festettek meg. A metszeteket 8 független festődési teljesítmény alapján értékelték, ahol mindhárom vizsgálóhely azonos gyártási tételből származó Bond Oracle HER2 IHC System rendszert használt. A festett metszeteken maszkolás után randomizált értékelést végeztek a Leica Biosystems, Newcastle Ltd egy tapasztalt vizsgálója segítségével a laboratóriumonkénti reprodukálhatóság meghatározására.

A laboratóriumonkénti reprodukálhatósági vizsgálat metszeteinek értékelése alapján 1477/1920 (76,93%) tesztelési mintahely volt értékelhető. 443 tesztelési adathely nem volt értékelhető az alábbiak miatt:

- A HER2 Control Slide nem megfelelő teljesítménye 2/24 esetben 2 festésnél/160 teszt mintahely lett eltávolítva. Ez az esemény az A és B vizsgálóhelyen egy-egy alkalommal történt meg (vizsgálóhelyenként 80–80 teszt mintahely lett eltávolítva).
- Eltérés volt a tesztelési tervtől a C vizsgálóhelyen, ahol 24 metszetet a Bond Oracle HER2 IHC System festés után manuálisan utófestettek hematoxilinnal. Ez erőteljes utófestődést okozott mind a HER2 Control Slides-on, mind a TMA tesztelési mintahelyeken, így 240 mintahely el lett távolítva.
- Az invazív tumor elvesztése miatt 23 mintahely el lett távolítva. Ez az esemény 23 alkalommal fordult elő az A vizsgálóhelyen, és a vizsgálathoz elvégzéséhez szükséges 192 egymás utáni TMA metszet legyártása során a szövet elvesztéséből egyenesen következett.

d) A BOND teljesen automatizált, fejlett festőrendszerében bekövetkezett nem megfelelő lemosás miatti értékelhetetlen festődés miatt 20 mintahely került eltávolításra.

A laboratóriumok közötti precizitás vizsgálata során az értékelhető metszetek kiértékelése a festődés variációját 79 esetben (5,28%) mutatta a lehetséges 1477 festődésből. Ezekből 14/1477 (0,95%) esetben 0 helyett 1+ vagy 2+ helyett 3+ volt megfigyelhető, ami emiatt nem jelentett a klinikai pozitív és negatív értékelések közti váltást a 2x2-es értékelésben. Siker aránya = 99,05% (95% CI = 98,42% – 99,46%). A 14 ilyen festődésből 5/1477 (0,34%) a Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (A vizsgálóhely), 8/1477 (0,54%) a B vizsgálóhely, és 1/1477 (0,07%) a C vizsgálóhely esetén fordult elő.

A maradék 65/1477 (4,40%) festődésnél 2+ helyett 1+ vagy 2+ helyett 0 volt megfigyelhető, ami emiatt váltást jelentett a klinikai pozitív és negatív értékelések között a 2x2-es értékelésben. Siker aránya = 95,6% (95% CI = 94,42% – 96,54%). A 65 klinikailag szignifikáns változásból 11/65 (16,9%) a Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (A vizsgálóhely), 24/65 (36,9%) a B vizsgálóhely, és 30/65 (46,1%) a C vizsgálóhely esetén fordult elő. A klinikailag szignifikáns változások egyik esetében sem fordult elő, hogy 3+ helyett negatív (0 vagy 1+) besorolás történt volna vagy fordítva.

E. Értékelők közötti reprodukálhatóság

40 véletlenszerűen kiválasztott invazív emlőrákos esetből, melyek a különböző HER2 IHC besorolások közt egyenletesen oszlanak el (rezekciós minták) egymás utáni metszeteket készítettek, és ezeket a Leica Biosystems, Newcastle Ltd (A vizsgálóhely), a B vizsgálóhely és a C vizsgálóhely számára festésre és értékelésre kiadták. A metszeteket maszkolták és randomizálták az értékelés előtt. A vizsgálók közti egyezés a B és C vizsgálóhelyen 87,5% volt (95% CI = 73,3% – 95,8%). A B, illetve C vizsgálóhely és a Leica Biosystems Newcastle, Ltd közötti egyezés 92,5% (95% CI = 79,6% – 98,4%), illetve 85% volt (95% CI = 70,1% – 94,29%). Az összes egybeesés elemzése a 3 vizsgálóhely (A, B, C) között 82,50%.

F. Műszerek közötti pontosság (BOND-MAX vs BOND-III)

A műszerek közti pontosság vizsgálatát a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerben egyetlen független, európai vizsgálóhelyen végezték el. A vizsgált mintákat száz és harmincnyolc (138) invazív emlőrákos esetből (túbiopszia és rezekció) származó, formalinnal fixált, paraffin beágyazású blokkokból nyerték. A műszerek közti pontosság vizsgálatát a vizsgálóhelyen végezték el, a festés egymás utáni metszetekkel a BOND-MAX és BOND-III platformokon történt. 3 eset a minta/tumor jelenléte miatt nem megfelelőnek lett nyilvánítva, és el lett távolítva a vizsgálatból.

Azonos tételszámú Bond Oracle HER2 IHC System és BOND Instrument segédreagenseket használtak minden műszeren. Metszeteket visszamenőleg. A metszeteket a vizsgálóhelyen egyetlen, tapasztalt vizsgáló értékelt a műszerek közti precizitás meghatározása céljából.

A műszerek közti precizitás kiértékelése alapján 94,2%-os (130/138) 2x2-es konkordancia volt tapasztalható a pozitív (2+, 3+) és a negatív (0, 1+) esetek között 95%-os CI (88,9 – 97,5%); valamint 87,0%-os (120/138) 3x3-as konkordancia a pozitív (3+), a bizonytalan (2+) és a negatív (0, 1+) esetek között 95%-os CI (80,2 – 92,1%) mellett.

		BOND-MAX		
		Negatív (0/1+)	Pozitív (2/3+)	Összesen
BOND-III	Negatív (0/1+)	80	1	81
	Pozitív (2/3+)	7	50	57
	Összesen	87	51	138

Átlagos konkordancia (95% CI) = 94,2% (88,9 – 97,5%)

14. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC System festődés 2x2-es átlagos konkordanciája a BOND-MAX és BOND-III platformokon.

		BOND-MAX			
		Negatív (0/1+)	Bizonytalan (2+)	Pozitív (3+)	Összesen
BOND-III	Negatív (0/1+)	80	1	0	81
	Bizonytalan (2+)	6	5	1	12
	Pozitív (3+)	1	9	35	45
	Összesen	87	15	36	138

Átlagos konkordancia (95% CI) = 87,0% (80,2 – 92,1%)

15. táblázat A Bond Oracle HER2 IHC System festődés 3x3-as átlagos konkordanciája a BOND-MAX és BOND-III platformokon.

Össességében az ebből a vizsgálatból nyert adatok azt bizonyítják, hogy a Leica Biosystems BOND-MAX és BOND-III Systems között magas konkordancia áll fenn a Bond Oracle HER2 IHC System használata esetén.

Hibaelhárítás

A hiba	A hiba oka	Teendő
Nem jön létre immun-hisztokémiai festődés	A festés a befejezés előtt félbeszakadt	A BOND programmal ellenőrizze, hogy voltak-e hibaüzenetek a festés alatt, majd járjon el a BOND program által javasolt módon.
	Helytelen protokoll lett kiválasztva	Ellenőrizze, hogy a megfelelő alapértelmezett értéket az Add slide (metszet hozzáadása) panel festési Protocol (protokoll) mezőjének *IHC Protocol H részében.
	A metszetek paraffinmentesítése nem megfelelő	Ellenőrizze, hogy az Add slide (metszet hozzáadása) panel Preparation (előkészítés) mezőjében a *Dewax mód legyen kiválasztva.
	Nem megfelelő reagens lett adagolva	Ellenőrizze, hogy minden BOND reagens a megfelelő tartályhoz van-e hozzárendelve, és megfelelően van-e elrendezve a berendezésben.
	A BOND Wash oldat nátriumaziddal szennyeződött	A megfelelő munkaerősséghez használjon friss BOND Wash oldatot.
Gyengén specifikus immun-hisztokémiai festődés	Nem megfelelő epitop visszanyerés	Ellenőrizze, hogy a megfelelő BOND Epitope Retrieval reagensek a megfelelő tartályokhoz vannak-e rendelve, és a BOND program alapértelmezésében a megfelelő epitop visszanyerési protokoll van *HIER 25 min with *ER1 (97).
	A tesztminta fixálása vagy feldolgozása nem megfelelő	Ellenőrizze, hogy formalin alapú fixálót használtak-e, valamint hogy a feldolgozási lépések megfelelőek-e a vizsgált mintához.
	Bond Oracle HER2 IHC System a lejárat dátum után lett felhasználva	Ellenőrizze, hogy a Bond Oracle HER2 IHC System csak a lejárat dátumon belül legyen felhasználva.

Túl erősen specifikus immun-hisztokémiai festődés	Nem megfelelő epitop visszanyerés	Ellenőrizze, hogy a megfelelő BOND Epitope Retrieval reagensok a megfelelő tartályokhoz vannak-e rendelve, és a BOND program alapértelmezésében a *HIER 25 min with *ER1 (97) protokoll szerepel-e.
	Fixálási eltérések	Ellenőrizze, hogy formalin alapú fixálót használtak-e, valamint hogy a feldolgozási lépések megfelelőek-e a vizsgált mintához. Lehetőség szerint végezzen új tesztet egy másik blokkal. Ha ez nem lehetséges, a legjobb fixálási mintát mutató területet értékelje ki egy megfelelő H&E festésű metszet segítségével.
A hiba	A hiba oka	Teendő
Nem specifikus háttérfestődés	Nem megfelelő reagens lett adagolva	Ellenőrizze, hogy minden BOND reagens a megfelelő tartályhoz van-e hozzárendelve, és megfelelően van-e elrendezve a berendezésben.
	A metszetek paraffinmentesítése nem megfelelő	Ellenőrizze, hogy az Add slide (metszet hozzáadása) Preparation (előkészítés) mezőjében a *Dewax mód legyen kiválasztva.
	Nem specifikus immun-hisztokémiai keresztreakció a szövetben	A normál szöveti keresztreakciókról lásd a Bond Oracle HER2 IHC System kézikönyvének 13. táblázatát.
	Nem specifikus immun-hisztokémiai keresztreakció a szövet nekrotikus területein	Ellenőrizze, hogy formalin alapú fixálót használtak-e, valamint hogy a feldolgozási lépések megfelelőek-e a vizsgált mintához. Lehetőség szerint végezzen új tesztet egy másik blokkal. Ha ez nem lehetséges, a legjobb fixálási mintát mutató területet értékelje ki egy megfelelő H&E festésű metszet segítségével.
	A festés után száradási műtermék keletkezik	Ha a metszeteket éjszakai festéssel kell megfesteni, célszerű alkalmazni a BOND késleltetett indítási funkcióját. A metszetek kiszáradásának megelőzésére ellenőrizze, hogy kellő mennyiségű desztillált vagy ionmentesített víz álljon rendelkezésre erre az időszakra az adagolóban.
	A metszetek egyes részei összetapadtak a kikeményedett adalékanyagok miatt	Használjon tapadásgátló tárgylemezeket (Leica BOND Plus Slides, termékkód: S21.2113 vagy Apex BOND Slides termékkód: 3800040).

A szövet leválik a beteg/kontroll lemezről	Nem megfelelő lemezeket használt vagy nem megfelelő elvezetést alkalmazott a metszeten	Használjon megfelelő lemezeket a beteg-/ellenőrzőmetszetekhez (Leica BOND Plus Slides, termékkód: S21.2113 vagy Apex BOND Slides termékkód: 3800040). Ellenőrizze, hogy a metszetek elvezetése megfelelő legyen, és 12–18 órán át 37 °C-on inkubálva legyenek (egész éjjel). Az erősebb tapadást igénylő metszetek esetén további egy órán át 60 °C-on inkubálás javasolt.
--	--	--

16. táblázat. Bond Oracle HER2 IHC System hibaelhárítási útmutató.

Ha a Bond Oracle HER2 IHC System rendszerrel kapcsolatos probléma kívül esik a hibaelhárítási útmutató (lásd 16. táblázat) tárgykörén, további segítségért lépjen kapcsolatba a helyi Leica Biosystems Műszaki szerviz részleggel vagy a forgalmazóval.

Referenciák

- Corbett IP, Henry JA, Angus B et al. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Pathology* 1990; 161:15-25.
- Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992-1003.
- Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. al. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:15s. (Abstr 4556).
- Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy resultst from the ToGA trial: A phase III study of traztuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285-9.
- Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165-72.
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255-63.
- Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825-31.
- Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1967; 14: 929-931.
- Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International* 1995; 45(2): 108-115.
- Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008.
- Bang YJ et al. Poster 4526 presented at the 44th ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, USA, 30 May–3 June 2008.
- Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805.

14. M. Tanner, M. Hollmén, T. T. Junttila, A. I. Kapanen, S. Tommola, Y. Soini, H. Helin, J. Salo, H. Joensuu, E. Sihvo, K. Elenius, and J. Isola. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II α gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology* (February 2005) 16(2): 273-278.
15. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
16. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1990; 17: 234-247.
17. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087-1898: USA
18. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special Report: Quality control in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1989 ;92: 836-43.
19. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62.
20. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry 2007* (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
23. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
24. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology* 2006.










Az előző verzió módosításai

Műszerek közötti pontosság (BOND-MAX vs BOND-III).

Kibocsátás dátuma

13 január 2020

Jelmagyarázat

	Sorozat kódja		Tárolás		Katalógusszám
	In vitro diagnosztikai orvosi eszköz		Gyártó		Törékeny
	Az utasításokat a kézikönyv tartalmazza		A tartalom <n> teszthez elegendő		Lejárat dátum: ÉÉÉÉ-HH-NN
SN	Sorozatszám				

A HercepTest™ a DakoCytomation, Denmark A/S védjegye, és licencelt termékeHerceptin® a Genentech, Inc. és a F. Hoffmann-La Roche Ltd. védjegye