

BOND™ Oracle™ HER2 IHC System Gebrauchsanleitung

Zum Gebrauch mit dem Leica Biosystems BOND Färbeautomaten

Produktcode TA9145 ist zum Färben von 60 Tests (150 Objektträgern) vorgesehen

60 Testobjektträger mit HER2 Primary Antibody

60 Testobjektträger mit HER2 Negative Control

15 HER2 Kontrollobjektträger mit HER2 Primary Antibody

15 positive interne Gewebekontrollen mit HER2 Primary Antibody

Deutsch



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



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

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

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

Inhalt

Verwendungszweck	3
Zusammenfassung und Erläuterungen	3
Hintergrundinformationen	3
HER2-Expression	3
Klinische Konkordanz - Zusammenfassung	3
Verfahrensprinzip	4
A. Gelieferte Komponenten	4
B. Gebrauchsanweisungen.....	5
C. Lagerung und Stabilität	5
D. Probenvorbereitung	5
E. Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen	6
Vorgehensweise	6
A. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien	6
B. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Komponenten	6
C. Methodik	7
D. Objektträger-Anordnung	7
E. Verfahrensschritte	8
Qualitätskontrolle	10
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	10
Gewebe für interne Positivkontrolle – HER2 Primary Antibody	11
Interne negative Kontrollgewebekomponente.....	11
Patientengewebe – HER2 Negative Control	11
Patientengewebe – HER2 Primary Antibody	11
Assay-Prüfung	11
Interpretation der Färbung.....	12
Reihenfolge der Objektträger beim Screening	13
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	13
2. Interne positive Kontrollgewebekomponente – HER2 Primary Antibody.....	13
3. Interne negative Kontrollgewebekomponente – HER2 Positive Control	13
4. Patientengewebe – gefärbt mit HER2 Negative Control	13
5. Patientengewebe – gefärbt mit HER2 Primary Antibody	13
Einschränkungen	13
A. Allgemeine Einschränkungen.....	13
B. Produktspezifische Einschränkungen	14
Zellliniendaten	15
Klinische Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und Dako HercepTest	15
2x2 Konkordanzergebnisse	16
3x3 Konkordanzergebnisse	17
Klinische Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	17
3x2 Konkordanzergebnisse.....	18
Immunreaktivität – Liste für normale Gewebe	19
Reproduzierbarkeitsstudie	20
Tests auf Präzision innerhalb eines Laufs/zwischen verschiedenen Läufen	20
A. Tests auf Präzision innerhalb eines Laufs (Intra-Run)	20
B. Test auf Präzision zwischen verschiedenen Läufen (Inter-Run)	20
C. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	21
D. Reproduzierbarkeit von Labor zu Labor	21
E. Reproduzierbarkeit von Beobachter zu Beobachter	22
F. Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät (BOND-MAX und BOND-III)	22
Fehlerbehebung	24
Quellen	26

Verwendungszweck

Für In-Vitro-Diagnostik

Das Bond Oracle HER2 IHC System ist ein halbquantitativer immunhistochemischer (IHC) Assay zur Bestimmung des Status des Onkoproteins HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) in Brustkrebsgewebe, das zur histologischen Untersuchung aufbereitet wurde. Das Bond Oracle HER2 IHC System ist zur Unterstützung der Beurteilung der Eignung von Patienten für eine Behandlung mit Herceptin® (Trastuzumab) vorgesehen (siehe Herceptin®-Packungsbeilage).

Hinweis: Alle Patientinnen in den klinischen Herceptin®-Studien wurden auf der Basis eines immunzytochemischen Clinical Trial Assays (CTA) ausgewählt. Keine der an diesen Studien teilnehmenden Patientinnen wurde mithilfe des Bond Oracle HER2 IHC System ausgewählt. Das Bond Oracle HER2 IHC System wurde unter Verwendung unabhängiger Proben mit dem Dako HercepTest™ verglichen. Wie aus der Zusammenfassung der klinischen Konkordanz hervorgeht, wurden dabei akzeptable Konkordanzergebnisse erzielt. Die tatsächliche Korrelation zwischen dem Bond Oracle HER2 IHC System und klinischen Ergebnissen wurde nicht ermittelt.

Zusammenfassung und Erläuterungen

Hintergrundinformationen

Das Bond Oracle HER2 IHC System enthält den monoklonalen Maus-Anti-HER2-Antikörper, Klon CB11. Der ursprünglich von Corbett et al (1) entwickelte und von Novocastra Laboratories Ltd (jetzt Leica Biosystems Newcastle Ltd) hergestellte Klon CB11 ist gegen die interne Domäne des Onkoproteins HER2 gerichtet.

Bei einem Teil der Brustkrebspatientinnen wird das Onkoprotein HER2 im Zuge der malignen Umwandlung und Tumorprogression überexprimiert (2). Aufgrund der Überexpression des in Brustkrebszellen gefundenen Onkoproteins HER2 bietet sich HER2 als Ziel einer auf Antikörpern basierenden Therapie an. Herceptin® ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (3), der sich mit hoher Affinität an das Onkoprotein HER2 bindet und nachweislich sowohl in vitro als auch in vivo (4-6) die Proliferation humaner Tumorzellen hemmt, die das Onkoprotein HER2 überexprimieren.

Seit der Vorstellung der ersten Immunperoxidasetechnik durch Nakane und Pierce (7) waren im Bereich der Immunhistochemie zahlreiche neue Entwicklungen zu verzeichnen, die zu erhöhter Sensibilität geführt haben. Eine seit kurzem eingesetzte Technik ist die Polymermarkierung. Diese Technologie wird sowohl auf Primärantikörper als auch auf immunhistochemische Detektionssysteme (8) angewendet. Das Compact Polymer™ Detektionssystem, das im Bond Oracle HER2 IHC System zum Einsatz kommt, gehört zu einer Familie neuer Technologien im Bereich der kontrollierten Polymerisation, die speziell zur Herstellung polymerer HRP-gekoppelter Antikörperkonjugate entwickelt wurden. Da diese Polymertechnologie bei der Oracle-Produktpalette eingesetzt wird, tritt das bei Streptavidin/Biotin-Detektionssystemen beobachtete Problem der unspezifischen endogenen Biotin-Färbung nicht auf.

HER2-Expression

Das Onkoprotein HER2 wird bei bis zu 20 Prozent der Adenokarzinome von unterschiedlichen Körperstellen in einem mit immunhistochemischen Methoden nachweisbaren Umfang exprimiert. 10 bis 20 Prozent der invasiven duktaalen Brustkarzinome sind HER2-positiv (9). 90 Prozent der duktaalen Karzinome in situ (DCIS) vom Comedo-Typ sind positiv (10), ebenso fast alle Fälle von Morbus Paget der Mamma (11).

Klinische Konkordanz - Zusammenfassung

Das Bond Oracle HER2 IHC System wurde als Alternative zum sich in der Prüfphase befindlichen Clinical Trial Assay (CTA) entwickelt, der bei den klinischen Studien zu Herceptin® eingesetzt wurde. Die Leistungsfähigkeit des Bond Oracle HER2 IHC System bezüglich der

Bestimmung der Überexpression des Onkoproteins HER2 wurde in einer unabhängigen Studie untersucht, bei der die mit dem Bond Oracle HER2 IHC System erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen des Dako HercepTests in Bezug auf 431 Brusttumorproben amerikanischen Ursprungs verglichen wurden. Keine dieser Tumorproben stammte von Patientinnen, die an den klinischen Herceptin® Studien teilnahmen. Dabei ergab sich eine Konkordanz von 92,34 % bei der 2x2-Analyse (95 % Konfidenzintervalle von 89,42 % - 94,67 %) und von 86,54 % bei der 3x3-Analyse (95 % Konfidenzintervalle von 82,95 % - 89,62 %) zwischen den Ergebnissen der beiden Assays.

Verfahrensprinzip

Das Bond Oracle HER2 IHC System enthält Komponenten, die zur Durchführung einer immunhistochemischen Färbung formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebeproben erforderlich sind. Nach der Inkubation mit dem gebrauchsfertigen HER2 Primary Antibody (Klon CB11) kommt bei diesem System gebrauchsfertige Compact Polymer-Technologie zur Anwendung. Die enzymatische Umwandlung des anschließend hinzugefügten Chromogens führt zur Bildung eines sichtbaren Reaktionsprodukts am Ort der Antigenbindung. Die Gewebepreparate können anschließend gegengefärbt, dehydriert, geklärt und mit Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Zur Bewertung der Färbeläufe werden Kontrollobjektträger mit vier formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Brustkrebszelllinien bereitgestellt. Die vier Zelllinien zeigen eine Expression des Onkoproteins HER2 mit einer Intensität von 0, 1+, 2+ und 3+. Die Färbeintensität dieser Zelllinien entspricht sowohl der HER2 Rezeptordichte pro Zelle als auch dem Status der HER2 Genverstärkung. Das Bond Oracle HER2 IHC System (Produktcode TA9145) ist für den Einsatz im Leica Biosystems BOND Färbeautomaten vorgesehen.

Gelieferte Komponenten

Die nachfolgend aufgeführten Materialien (Tabelle 1) reichen zum Färben von 150 Objektträgern aus (60 mit HER2 Primary Antibody inkubierte Testobjektträger, 60 entsprechende, mit HER2 Negative Control inkubierte Testobjektträger, 15 mit HER2 Primary Antibody inkubierte HER2 Control Slides und 15 mit HER2 Primary Antibody inkubierte interne Positivgewebekontrollen. Die Anzahl der Tests basiert auf der Annahme, dass pro Objektträger 150 µL automatisch dosiert werden. Das Kit enthält für maximal 15 BOND Färbeläufe ausreichende Materialien.

HER2 Control Slides, (x15)	Aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Brustkrebs-Zelllinien hergestellte Schnitte, die bei Färbung gemäß dem mitgelieferten Protokoll eine Expression des Onkoproteins HER2 mit einer Färbeintensität von 0, 1+, 2+ und 3+ zeigen. Diese Schnitte sind vollständig adhärent und müssen nicht weiter aushärten.
HER2 Primary Antibody, 13.5 mL	Enthält gebrauchsfertigen, affinitätsgereinigten, monoklonalen Maus-IgG-Antikörper, Klon CB11 und 0,035 % 2-Methylisothiazol-3(2H)-on.
HER2 Negative Control, 9 mL	Enthält gebrauchsfertigen Maus-IgG-Antikörper in einer dem HER2 Primary Antibody äquivalenten Konzentration und 0,035 % 2-Methylisothiazol-3(2H)-on.
Peroxide Block, 22.5 mL	Enthält 3-4 % Wasserstoffperoxid
Post Primary, 22.5 mL	Kaninchen-Anti-Maus-IgG (<10 µg/mL) mit 10 % (v/v) tierischem Serum in TRIS-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung und 0,01 % 2-Methylisothiazol-3(2H)-on.

Polymer, 22.5 mL	Poly-HRP-Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG (<25 µg/mL) mit 10 % (v/v) tierischem Serum in TRIS-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung und 0,01 % 2-Methylisothiazol-3(2H)-on.
DAB Part 1, 2.25 mL	Enthält 66 mM 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Stabilisatorlösung.
DAB Part B (x2), 22.5 mL	Enthält ≤0,1 % (v/v) Wasserstoffperoxid.
Hematoxylin, 22.5 mL	Enthält <0,1 % Hämatoxylin

Tabelle 1. Komponenten des Bond Oracle HER2 IHC System

Gebrauchsanweisungen

Alle im Lieferumfang enthaltenen Reagenzien sind speziell für den Einsatz bei diesem Assay konzipiert, und die Chargennummern sind für jedes einzelne Bond Oracle HER2 IHC System spezifisch. Um die korrekte Durchführung des Assays zu gewährleisten, dürfen keine Reagenzien ausgetauscht werden.

Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Unmittelbar nach dem Gebrauch erneut bei 2–8 °C lagern. Durch jede Abweichung von diesen Bedingungen verliert der Assay seine Gültigkeit. Es ist darauf zu achten, dass das Verfallsdatum des verwendeten Bond Oracle HER2 IHC System nicht überschritten wird. Folgende Anzeichen deuten auf eine Verunreinigung und/oder Instabilität des Bond Oracle HER2 IHC System hin: Trübe Lösungen, Geruchsentwicklung und das Vorhandensein von Niederschlägen. Andere Lagerbedingungen als die oben angegebenen müssen vom Anwender selbst getestet werden.

Probenvorbereitung

Alle Proben müssen so vorbereitet werden, dass das Gewebe für die immunhistochemische Färbung erhalten bleibt. Für alle Proben (12) sind die Standardmethoden der Gewebeaufbereitung anzuwenden.

Das Fixieren der Gewebe in formalinhaltigem Fixiermittel sowie die Routineverarbeitung und Einbettung in Paraffin wird empfohlen. Beispielsweise sollten Resektionsproben in Blöcke von 3-4 mm Dicke geschnitten und 18–24 Stunden in 10 % neutral gepuffertem Formalin eingelegt werden. Anschließend sollten die Gewebe in abgestuft konzentriertem Alkohol dehydriert, mit Xylen geklärt und anschließend in geschmolzenes Paraffinwachs eingebettet werden, dessen Temperatur nicht über 60 °C liegen sollte. Gewebeproben sollten mit einer Dicke von 3–5 µm geschnitten werden.

Die für die Bestimmung des Onkoproteins HER2 und die Tumordiagnose erforderlichen Objektträger sind gleichzeitig vorzubereiten. Zur Erhaltung der Antigenität sollten auf Objektträger (Leica BOND Plus Slides – Produktcode S21.2113 oder Apex BOND Slides – Produktcode 3800040) aufgebrachte Gewebepreparate bei Lagerung bei Raumtemperatur (18–24 °C) innerhalb von 4-6 Wochen nach der Schnitterstellung gefärbt werden. Es wird empfohlen, die Objektträger nach der Schnitterstellung 12–18 Stunden (über Nacht) bei 37 °C zu inkubieren. Schnitte, die eine stärkere Haftung erfordern, können eine weitere Stunde bei 60 °C inkubiert werden.

In den USA schreibt der Clinical Laboratory Improvement Act aus dem Jahr 1988 unter 42 CFR 493.1259(b) vor, dass "das Labor gefärbte Objektträger mindestens zehn Jahre und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab dem Datum der Untersuchung aufbewahren muss".

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Nur für professionelle Anwender

Von einer oder mehreren Komponenten des Produkts geht eine Gesundheitsgefährdung aus. Grundsätzlich dürfen mit diesem Produkt nur Personen über 18 Jahre arbeiten. Die Benutzer sind ausführlich über die korrekten Arbeitsabläufe, die gesundheitsgefährdenden Eigenschaften des Produkts und die erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen zu informieren.

Zu den Symptomen einer Überexposition mit ProClin™ 950, dem bei den Oracle Reagenzien verwendeten Konservierungsmittel, gehören Haut- und Augenreizung sowie Reizung der Schleimhäute und oberen Atemwege. Die maximale Konzentration von ProClin™ 950 in diesem Produkt beträgt 0,35 %. Diese Lösungen erfüllen nicht die durch die OSHA (Occupational Safety & Health Administration) definierten Kriterien eines Gefahrstoffs. Ein Material Safety Data Sheet steht auf Anfrage oder unter folgender Adresse zur Verfügung: www.LeicaBiosystems.com.

Proben vor und nach der Fixierung und alle mit ihnen in Kontakt kommenden Materialien sind wie infektiöses Material zu behandeln und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen zu entsorgen.

Reagenzien dürfen unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden, und der Kontakt von Haut und Schleimhäuten mit Reagenzien und Proben ist zu vermeiden. Empfindliche Bereiche, die mit Reagenzien oder Proben in Kontakt gekommen sind, sind mit reichlich Wasser zu spülen. Ärztlichen Rat einholen. Potenziell toxische Komponenten sind gemäß den auf Bundes-, Landes oder Regionalebene geltenden Bestimmungen zu entsorgen.

Die mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien kann zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen führen und ist daher auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

Vorgehensweise

A. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

- BOND Dewax Solution (Produktcode AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (Produktcode AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (Produktcode AR9590)
- In der Immunhistochemie verwendete Standardlösungsmittel (z. B. Äthanol, rein und in abgestuften Konzentrationen)
- Xylen (oder Xylenersatzstoffe)
- Eindeckmedium
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser

B. Erforderliche, aber nicht im Lieferumfang enthaltene Komponenten

- Leica Biosystems' BOND-MAX und BOND-III Färbeautomat(en)
- BOND Universal Covertiles (Produktcode S21.2001, S21.4583 oder S21.4611)
- BOND Mixing Stations (Produktcode S21.1971)
- Trockenofen, der eine Temperatur von 60 °C halten kann
- Lichtmikroskop (4–40-fache Objektivvergrößerung)
- Objektträger (Leica BOND Plus Slides – Produktcode S21.2113 oder Apex BOND Slides – Produktcode 3800040)
- Deckgläser
- BOND Slide Label & Print Ribbon (Produktcode S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (Produktcode CS9100)

C. Methodik

- Vor dem Einsatz dieser Methodik müssen die Anwender in BOND Automatik-IHC-Techniken geschult werden.
- Zu jedem mit HER2 Primary Antibody zu färbenden Testschnitt muss ein identischer Schnitt zur Färbung mit HER2 Negative Control vorhanden sein. Der Negativkontrollschnitt ermöglicht die Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Färbung am Ort der Antigenbindung. Jeder BOND Färbelauf sollte einen HER2 Control Slide beinhalten. Wenn die Zelllinien am Ende des Färbeprotokolls nicht die korrekten Färbemuster aufweisen (siehe Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), ist der Färbelauf als ungültig zu betrachten.

D. Objektträger-Anordnung

Für jeden Objektträger ist ein neues BOND Universal Covertile (Produktcode S21.2001, S21.4583 oder S21.4611) zu verwenden. Die Verwendung von BOND Universal Covertiles, die zuvor bei der immunhistochemischen Färbung oder Färbung mit In-Situ-Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde für diesen Test nicht validiert.

Die in Tabelle 2 dargestellte Anordnung der Objektträger auf dem Objektträgerschlitten ermöglicht eine optimale Leistung des Bond Oracle HER2 IHC System und die erfolgreiche Durchführung aller 60 Tests.

Objektträgerposition	Objektträgerbeschreibung	Reagenz	Gewebetyp	Objektträgersymbol
1	Fall 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Fall 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Fall 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Fall 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Fall 1	*HER2PrimaryAntibody	Test	
6	Fall 2	*HER2PrimaryAntibody	Test	
7	Fall 3	*HER2PrimaryAntibody	Test	
8	Fall 4	*HER2PrimaryAntibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Positiv	
10	Interne Gewebekontrolle	*HER2PrimaryAntibody	Positiv	

Tabelle 2. Anordnung der Objektträger auf dem Objektträgerschlitten mit Gewebetyp und Reagenz

E. Verfahrensschritte

Führen Sie die nachfolgend beschriebenen Schritte aus, um einen Objektträgerschlitten mit der in Tabelle 2 beschriebenen Anordnung vorzubereiten. Diese Anweisungen sind zusammen mit dem BOND System User Manual zu lesen.

1. Stellen Sie sicher, dass die Vorrats- und Abfallbehälter am BOND Gerät genügend Aufnahmekapazität für die erforderlichen Färbeläufe haben.
2. Sorgen Sie dafür, dass genügend Alkohol, destilliertes oder entionisiertes Wasser, BOND Dewax Solution (gebrauchsfertig bereitgestellt), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (gebrauchsfertig bereitgestellt) und BOND Wash Solution (als x10-Konzentrat bereitgestellt) zur Durchführung der erforderlichen Färbeläufe in den Vorratsbehältern vorhanden ist.
3. Vergewissern Sie sich, dass eine saubere BOND Mixing Station installiert ist.
4. Schalten Sie den BOND Färbeautomaten ein.
5. Schalten Sie den an den BOND Färbeautomaten angeschlossenen BOND Controller ein.
6. Starten Sie die BOND Software.
7. Scannen Sie bei einem neuen Bond Oracle HER2 IHC System die Barcodes der Reagenzienschlitten mit dem Handscanner ein, um die Daten in den BOND Reagenzienbestand aufzunehmen.
8. Öffnen Sie den Bildschirm "Slide" und klicken Sie auf Add case.
9. Geben Sie die Details des ersten Falls ein. Das Dispensiervolumen sollte auf 150 µL und das Vorbereitungsprotokoll auf *Dewax eingestellt sein. Klicken Sie auf "OK"
10. Klicken Sie im Bildschirm "Slide" auf Add slide, während der Fall hervorgehoben ist
11. Fügen Sie zuerst die Testobjektträger der Patienten hinzu. Der Gewebetyp sollte auf Test tissue gesetzt sein.
12. Das Dispensiervolumen sollte auf 150 µL und das Vorbereitungsprotokoll auf *Dewax eingestellt sein.
13. Wählen Sie als Färbemoduswerte Single und Oracle aus (nicht auf Oracle control klicken).
14. Wählen Sie als Prozess IHC aus.
15. Wählen Sie aus der Marker-Liste *HER2 Negative Control aus. Auf der Registerkarte "Protocols" wird standardmäßig das richtige Färbeprotokoll (*IHC Protocol H) und HIER-Protokoll (*HIER 25 min with ER1 (97)) angezeigt
16. Klicken Sie auf Add slide. Der Reagenzienobjektträger für die Negativkontrolle wird erstellt.
17. Wählen Sie - immer noch im Dialog "Add slide" - den Eintrag *HER2 Primary Antibody aus der Marker-Liste aus. Die Standardprotokolle und alle anderen Einstellungen bleiben unverändert.
18. Klicken Sie auf Add slide. Der Testobjektträger wird erstellt.
19. Wiederholen Sie die Schritte 8 bis 18, bis alle Fälle und Patiententestobjektträger erstellt wurden.
20. Erstellen Sie als Nächstes den HER2 Control Slide. Entsprechend der in Ihrem Labor üblichen Vorgehensweise fügen Sie ihn dem letzten Fall hinzu oder erstellen einen neuen Fall für Kontrollobjektträger.

Wichtiger Hinweis: Beim Arbeiten mit dem Bond Oracle HER2 IHC System muss zu jedem Durchlauf (d. h. zu jedem Objektträgerschlitten) ein HER2 Control Slide mit einbezogen werden, um den Assay bewerten zu können.

21. Setzen Sie im Dialog "Add slide" den Gewebetyp auf Positive tissue.
22. Klicken Sie auf Oracle control.
23. Wählen Sie die Chargennummer des HER2 Control Slide in der Liste Lot No aus. Die Chargennummer steht im Etikettenbereich des Objektträgers.

Wichtiger Hinweis: Der HER2 Control Slide muss vom selben Bond Oracle HER2 IHC System stammen, das für den Assay eingesetzt wird.
24. Wählen Sie den Eintrag *HER2 Primary Antibody aus der Marker-Liste aus. Behalten Sie Dispensiervolumen, Färbemodus, Verarbeitungs- und Protokolleinstellungen bei.
25. Klicken Sie auf Add slide, um den HER2 Control Slide hinzuzufügen.
26. Fügen Sie schließlich einen Objektträger für die interne Positivkontrolle hinzu.
27. Heben Sie die Auswahl von Oracle control auf.
28. Wählen Sie *HER2 Primary Antibody aus der Marker-Liste aus. Behalten Sie Dispensiervolumen, Färbemodus, Verarbeitungs- und Protokolleinstellungen bei. Als Gewebetyp bleibt Positive tissue aktiviert.
29. Klicken Sie auf Add slide. Dadurch wird die Objektträgererstellung abgeschlossen.
30. Drucken Sie Objektträgeretiketten aus. Alle Oracle Objektträgeretiketten sind mit "OC" bedruckt. Die Beschriftung des HER2 Control Slide beinhaltet auch die Chargennummer des Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Versehen Sie die Objektträger mit geeigneten Etiketten.
32. Öffnen Sie die Deckel aller Container des Bond Oracle HER2 IHC System und setzen Sie den Reagenzschlitten in den BOND ein.
33. Platzieren Sie die Objektträger in der in Abschnitt D, Tabelle 2, angegebenen Reihenfolge auf dem Objektträgerschlitten. Verwenden Sie neue Covertiles.
34. Setzen Sie den Objektträgerschlitten in den BOND ein und drücken Sie Load/Unload.
35. Prüfen Sie, ob die Objektträger gescannt wurden, und klicken Sie im Systemstatusbildschirm auf Run (Play).
36. Vergewissern Sie sich, dass im Schlittenindikatorfeld Proc (OK), die Chargennummer und der Endzeitpunkt angezeigt werden.
37. Drücken Sie nach Abschluss des Färbelaufs Load/Unload und entnehmen Sie die Objektträgerschlitten aus dem BOND.
38. Entfernen Sie die Covertiles und spülen Sie die Objektträger in entionisiertem Wasser.
39. Dehydrieren und klären Sie die Schnitte und versehen Sie sie mit Deckgläsern.

Qualitätskontrolle

Unterschiede in Bezug auf Gewebefixierung, Verarbeitung und Einbettung im Labor des Anwenders können zu erheblichen Schwankungen bei den Ergebnissen führen, was eine regelmäßige Durchführung interner Kontrollen (zusätzlich zur Verwendung der von Leica Biosystems mit dem Bond Oracle HER2 IHC System bereitgestellten HER2 Control Slides) erforderlich macht. Siehe Qualitätskontrollrichtlinien des College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry sowie CLSI (ehemals NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (12) und Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (13). Außerdem finden Sie in Tabelle 3 eine Übersicht über die verschiedenen Arten von immunhistochemischen Qualitätskontrollen und ihren Zweck.

Probe*	Beschreibung	HER2 Primary Antibody Färbung	HER2 Negative Control Färbung
HER2 Control Slide	Wie im Lieferumfang des Bond Oracle HER2 IHC System enthalten.	Kontrolliert den Färbevorgang und gibt Auskunft über die Reagenzienleistung.	Detektion unspezifischer Hintergrundfärbung
Internes positives Kontrollgewebe	Gewebe mit Ziel-Antigen. Die ideale Kontrolle ist ein schwach positiv färbendes Gewebe, das die Bestimmung geringfügiger Veränderungen in der Sensibilität des Primärantikörpers ermöglicht.	Dient zur Kontrolle aller Schritte der Analyse. Validiert die Gewebepvorbereitung und die Färbeleistung des Bond Oracle HER2 IHC System.	
Interne negative Kontrollgewebekomponente	Gewebe oder Zellen, von denen zu erwarten ist, dass sie negativ sind (können in Patientengewebe oder in positiven/negativen Kontrollgewebekomponenten enthalten sein).	Detektion unspezifischer Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Zellen/ Zellkomponenten	

*Pro Patientenprobe fixiert und bearbeitet

Tabelle 3. Immunhistochemische Qualitätskontrollen und ihr Zweck

Beim Kontrollgewebe sollte es sich um Biopsieproben oder chirurgische Proben handeln, die wie die Patientenproben schnellstmöglich in Formalin fixiert, bearbeitet und in Paraffin eingebettet wurden. Alle Proben müssen so behandelt werden, dass die Antigenität für die immunhistochemische Färbung erhalten bleibt. Für alle Proben sind die Standardmethoden der Gewebeaufbereitung anzuwenden (12).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Jeder der bereitgestellten HER2 Control Slides enthält vier formalinfixierte, in Paraffin eingebettete humane Brustkrebszelllinienkerne mit Färbeintensitäten von 0, 1+, 2+ und 3+. Bei jedem Testlauf (d. h. jedem Objektträgerschlitten) muss ein HER2 Control Slide einbezogen werden. Die korrekte Auswertung des von Leica Biosystems bereitgestellten HER2 Control Slide gibt Aufschluss über die Gültigkeit des Tests (siehe Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Anhand der im Lieferumfang dieses Systems enthaltenen HER2 Control Slides kann nur die Reagenzienleistung, nicht aber die Gewebeaufbereitung beurteilt werden.

Gewebe für interne Positivkontrolle – HER2 Primary Antibody

Falls interne positive Kontrollgewebekomponenten verwendet werden, sollte es sich um Biopsieproben oder chirurgische Proben handeln, die wie die Patientenproben schnellstmöglich formalinfixiert, bearbeitet und in Paraffin eingebettet wurden. Positive Gewebekontrollen ermöglichen eine Beurteilung der korrekten Gewebepreparation und gültiger Färbetechniken. Bei jedem Testlauf sollte zumindest eine Positivkontrollkomponente vorgesehen werden. Der Positivkontrollschnitt sollte eine schwach positive Färbung aufweisen, um die Bestimmung geringfügiger Veränderungen in der Sensibilität des Primärantikörpers zu ermöglichen.

Hinweis: Bekannte positive Kontrollgewebekomponenten sollten nur zur Kontrolle des korrekten Verhaltens aufgearbeiteter Gewebe zusammen mit Testreagenzien, aber NICHT zur Unterstützung der spezifischen Interpretation von Patientenproben genutzt werden. Wenn das positive Kontrollgewebe keine adäquate positive Färbung aufweist, sind die mit Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig zu betrachten.

Ein Mehrfachgewebekontrollblock mit Tumorgewebe, das alle 4 HER2 Grade repräsentiert, kann ebenfalls als Material für die interne Kontrolle genutzt werden.

Interne negative Kontrollgewebekomponente – HER2 Primary Antibody

Falls interne negative Kontrollkomponenten verwendet werden, sollte es sich um frische Biopsieproben oder chirurgische Proben handeln, die wie die Patientenproben schnellstmöglich formalinfixiert, bearbeitet und in Paraffin eingebettet wurden. Wenn ein bekanntermaßen HER2-negatives Kontrollgewebe bei den einzelnen Färbeläufen verwendet wird, kann die Spezifität des Primärantikörpers sowie eine etwaige unspezifische Hintergrundfärbung beurteilt werden. Aus der Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebepreparaten vorhanden sind, ergeben sich interne negative Kontrollstellen (vom Anwender zu überprüfen). Normale, nicht mit dem Tumor in Zusammenhang stehende Brustkanäle können als Referenzmaterial zur Beurteilung der Gültigkeit des Assays dienen. Wenn bei dem Gewebe für die interne Negativkontrolle eine spezifische Färbung auftritt, sind die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig zu betrachten.

Als Negativ- und Positivkontrollgewebe können Mehrfachgewebekontrollblöcke verwendet werden, die alle vier HER2 Grade repräsentieren.

Patientengewebe – HER2 Negative Control

Wenden Sie bei jedem Patiententest die bereitgestellte HER2 Negative Control anstelle des HER2 Primary Antibody auf ein entsprechendes Schnittpräparat an, um unspezifische Färbungen zu beurteilen und eine korrekte Interpretation der spezifischen Färbung des Onkoproteins HER2 an der Antigenstelle zu ermöglichen.

Patientengewebe – HER2 Primary Antibody

Die Intensität der positiven Färbung sollte im Kontext einer mit der HER2 Negative Control erzielten unspezifischen Hintergrundfärbung interpretiert werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Testergebnis, dass das Antigen nicht erkannt wurde - nicht, dass es in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden war. In den Abschnitten Reihenfolge der Objektträger beim Screening, Einschränkungen, Qualitätskontrolle und Immunreaktivität finden Sie Informationen bezüglich der Immunreaktivität des Bond Oracle HER2 IHC System .

Assay-Prüfung

Vor der ersten Anwendung eines Antikörpers oder Färbesystems im Rahmen eines diagnostischen Verfahrens sollte die Spezifität des Antikörpers durch Tests mit einer Reihe interner Gewebe mit bekannten immunhistochemischen Positiv- und Negativprofilen überprüft werden. Siehe den Abschnitt Qualitätskontrolle sowie die Qualitätskontrollanforderungen des CAP Certification Program for Immunohistochemistry und/oder CLSI (ehemals NCCLS) Quality Assurance for

Immunocytochemistry, Approved Guideline (12). Diese Qualitätskontrollverfahren sollten für jede neue Antikörpercharge und bei jeder Änderung der Assay-Parameter durchgeführt werden. Das humane invasive (infiltrierende) duktales Brustkarzinom mit bekannten Färbeintensitäten des Onkoproteins HER2 zwischen 0 bis 3+ und andere ausreichend negative Gewebe sind für die Assay-Überprüfung geeignet.

Interpretation der Färbung

Zur Bestimmung der Expression des Onkoproteins HER2 sollten nur Membranfärbemuster und -intensität nach der in Tabelle 4 dargestellten Skala bewertet werden. Die Bewertung der Objektträger sollte von einem Pathologen mithilfe eines Hellfeldmikroskops durchgeführt werden. Zur Bewertung der immunhistochemischen Färbung und zur Einstufung eignet sich ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung. Zur Bestätigung der Einstufung ist ein Objektiv mit 20- bis 40-facher Vergrößerung zu verwenden. Die zytoplasmatische Färbung ist als unspezifische Färbung zu bewerten und nicht in die Beurteilung der Intensität der Membranfärbung einzubeziehen (14). Der Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide enthält Beispielbilder der Färbeintensitäten, um die Unterscheidung zwischen den Färbeintensitäten 0, 1+, 2+ und 3+ zu erleichtern. Nur Präparate von Patientinnen mit invasivem Brustkarzinom sollten eingestuft werden. Bei Fällen von Carcinoma *in situ* und invasivem Karzinom in derselben Probe sollte nur die invasive Komponente eingestuft werden.

Immunhistochemisches Färbemuster	Einstufung	Beurteilung
Keine Färbung oder Membranfärbung bei weniger als 10 % der Tumorzellen.	0	Negativ
Schwache/kaum wahrnehmbare Membranfärbung bei mehr als 10 % der Tumorzellen. Die Zellmembranen sind nur teilweise gefärbt.	1+	Negativ
Schwache bis mäßige vollständige Membranfärbung bei mehr als 10 % der Tumorzellen.	2+	Mehrdeutig (Schwach positiv)
Starke vollständige Membranfärbung bei mehr als 10 % der Tumorzellen.	3+	Stark positiv

Tabelle 4. Interpretation der HER2-Färbung

Mit dem Bond Oracle HER2 IHC System erzielte Färbeergebnisse werden bei einer Expression des Onkoproteins HER2 mit einem Wert von 0 und 1+ als negativ, bei einem Wert von 2+ als mehrdeutig (schwach positiv) und bei einem Wert von 3+ als stark positiv interpretiert. Das Bond Oracle HER2 IHC System ist nicht dafür vorgesehen, dem Patienten und/oder Arzt prognostische Informationen zu liefern und ist in dieser Hinsicht auch nicht validiert worden. Für jede Färbungsbewertung sollten Objektträger in der nachfolgend angegebenen Reihenfolge untersucht werden, um die Gültigkeit des Färbelaufs zu beurteilen und eine halbquantitative Beurteilung der Färbeintensität des Probengewebes zu ermöglichen.

Reihenfolge der Objektträger beim Screening

Die Objektträger sollten in der folgenden Reihenfolge untersucht werden:

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Ein gültiger Assay mit dem Oracle HER2 Control Slide zeigt folgendes Ergebnis:

- Vorhandensein einer starken braunen, vollständigen Zellmembranfärbung in der 3+-Kontrollzelllinie SK-BR-3.
- Vorhandensein einer schwachen bis mäßigen braunen, vollständigen Zellmembranfärbung in der 2+-Kontrollzelllinie MDA-MB-453.
- Vorhandensein einer schwachen/kaum wahrnehmbaren, unvollständigen Zellmembranfärbung in der 1+-Kontrollzelllinie MDA-MB-175.
- Keine Färbung in der 0-Kontrollzelllinie MDA-MB-231.

Wichtiger Hinweis: Ein Merkmal der 1+-Kontrollzelllinie MDA-MB-175 ist ein deutliches Wachstumsmuster, bei dem die Zellen Cluster bilden. Durch diese Cluster entsteht eine kontinuierliche luminale Bürstensaumregion. Diese Bürstensaumfärbung ist stärker als die Färbung der übrigen Zellmembran. Die schwache/kaum wahrnehmbare unvollständige Zellmembranfärbung ist das korrekte 1+-Färbemuster des Onkoproteins HER2. Bei dieser Zelllinie kann auch eine punktförmige Immunfärbung des Golgi-Apparats im Zytoplasma auftreten.

2. Interne positive Kontrollgewebekomponente – HER2 Primary Antibody

Entsprechend dem bekannten Status des Onkoproteins HER2 der gewählten Positivkontrolle sollte das VORHANDENSEIN einer braunen Membranfärbung beobachtet werden.

3. Interne negative Kontrollgewebekomponente – HER2 Positive Control

Das FEHLEN einer Membranfärbung sollte beobachtet werden. Eine negative Kontrollgewebekomponente bestätigt das Fehlen einer Kreuzreaktivität des Detektionssystems mit den spezifisch angesprochenen Zellen/Zellkomponenten. Wenn bei einer negativen Kontrollgewebekomponente eine Membranfärbung auftritt, sollten die mit der Patientenprobe erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

4. Patientengewebe – gefärbt mit HER2 Negative Control

Durch das FEHLEN einer Membranfärbung wird die spezifische Markierung des Zielantigens durch den Primärantikörper bestätigt. Andere Braunfärbungen im Zytoplasma der mit HER2 Negative Control behandelten Probe, beispielsweise in Bindegewebe, Leukozyten, Erythrozyten oder nekrotischem Gewebe, sind als unspezifische Hintergrundfärbung zu werten und zu dokumentieren.

5. Patientengewebe – gefärbt mit HER2 Primary Antibody

Der Grad der Expression des Onkoproteins HER2 wird anhand der in Tabelle 4 sowie im Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide definierten Kriterien bewertet.

Einschränkungen

A. Allgemeine Einschränkungen

Die Immunhistochemie ist eine mehrere Schritte umfassende Labortechnik zur Interpretation und Bestimmung histopathologischer Merkmale. Sie erfordert eine spezielle Schulung in Bezug auf alle Aspekte des Verfahrens (einschließlich Auswahl geeigneter Reagenzien, Gewebe, Fixier- und Aufbereitungsmethoden sowie Vorbereitung der IHC-Objektträger) sowie in Bezug auf die Interpretation.

Die immunhistochemische Färbung von Gewebe setzt eine sachgemäße Vorbereitung, Fixierung und Bearbeitung des Gewebes voraus. Unsachgemäßes Fixieren, Gefrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen oder Schneiden oder Verunreinigung mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch negativen

Ergebnissen führen. Uneinheitliche Ergebnisse können auf Variationen bei Fixierung oder Einbettmethoden oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein (15). Auch übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann eine korrekte Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Unspezifische Färbungen haben meist ein diffuses Aussehen. Bei übermäßig formalinfixiertem Gewebe kann ebenfalls eine sporadische Färbung von Bindegewebe auftreten. Verwenden Sie zur Interpretation der Färberegebnisse intakte Zellen. Nekrotische oder degenerierte Zellen weisen oft eine unspezifische Färbung auf (16). Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer nicht immunologischen Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukten auftreten. Sie können - je nach Art der angewendeten immunhistochemischen Färbung - auch durch endogene Enzyme, wie beispielsweise Pseudoperoxidase (Erythrozyten) oder endogene Peroxidase (Zytochrom C), verursacht sein.

Gewebe von mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Patienten, bei denen das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) vorhanden ist, können eine unspezifische Färbung mit Meerrettich-Peroxidase aufweisen (17).

Unerwartete immunhistochemische Färbungen oder Färbvariationen können das Ergebnis von Veränderungen der Expressionsgrade der codierenden Gene oder Antigene sein. Jede Veränderung der erwarteten Färbemuster sollte im Zusammenhang mit allen anderen diagnostischen Untersuchungen interpretiert werden.

Die Interpretation immunhistochemischer Färbungen sollte durch morphologische Untersuchungen und die Verwendung geeigneter Kontrollmaterialien ergänzt und im Kontext der klinischen Anamnese des Patienten sowie anderer diagnostischer Untersuchungen durch einen qualifizierten Pathologen beurteilt werden.

Die Leistungsfähigkeit des Assays (d. h. die Bewertung der Eignung positiver und negativer Kontrollen) und die Interpretation immunhistochemischer Färbungen bzw. des Fehlens dieser Färbungen ist in einem entsprechend qualifizierten Labor unter der Leitung eines entsprechend qualifizierten und erfahrenen Pathologen durchzuführen, der für die Gesamtbeurteilung des immunhistochemischen Assays und seine Interpretation verantwortlich ist.

B. Produktspezifische Einschränkungen

Dieses Produkt ist nicht für den Einsatz bei der Durchflusszytometrie vorgesehen. Für die Durchflusszytometrie wurden keine Leistungsmerkmale ermittelt.

Falsch negative Ergebnisse können als Folge der Degeneration von Antigenen im Gewebepreparat gewertet werden. Die für die Bestimmung des Onkoproteins HER2 und die Tumerverifizierung erforderlichen Objektträger sind gleichzeitig vorzubereiten. Zur Erhaltung der Antigenität sollten auf Objektträger (Leica BOND Plus Slides – Produktcode S21.2113 oder Apex BOND Slides - Produktcode 3800040) aufgebrachte Gewebepreparate bei Lagerung bei Raumtemperatur (18–24 °C) innerhalb von 4-6 Wochen nach der Schnitterstellung gefärbt werden. Es wird empfohlen, die Objektträger nach der Schnitterstellung 12–18 Stunden bei 37 °C zu inkubieren. Präparate, die eine stärkere Haftung erfordern, können eine weitere Stunde bei 60 °C inkubiert werden.

Zwischen den Wachstumschargen der mit dem Bond Oracle HER2 IHC System verwendeten Zelllinien können minimale natürliche Variationen des immunhistochemischen Profils auftreten. Diese natürliche Variation liegt innerhalb der akzeptablen Toleranzgrenzen einer biologischen Einheit und beeinträchtigt nicht die Interpretation oder Leistung des Systems.

Auch die Charakterisierung der Zelllinien mithilfe der Durchflusszytometrie und In-Situ-Hybridisierung (wie in Tabelle 5 dargestellt) unterliegt natürlichen biologischen Variationen. Außerdem werden bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung technische und interpretationsbezogene Variationen der Kontrollzelllinien beobachtet (18).

Bei der Bewertung der HER2 Control Slides sollten die relevanten Verfallsdaten berücksichtigt werden. Lagern Sie das Bond Oracle HER2 IHC System bei 2–8 °C. Nicht einfrieren. Unmittelbar nach dem Gebrauch erneut bei 2–8 °C lagern. Durch jede Abweichung von

diesen Bedingungen verliert der Assay seine Gültigkeit.

Ersetzen Sie die im Bond Oracle HER2 IHC System enthaltenen Reagenzien nicht durch andere Komponenten (von Leica Biosystems oder anderen Herstellern). Dadurch würde der Assay seine Aussagekraft verlieren.

Alle in den Abschnitten C bis E (Vorgehensweise) beschriebenen Schritte müssen in der angegebenen Reihenfolge ausgeführt werden. Durch jede Abweichung von dieser Reihenfolge verliert der Assay seine Gültigkeit.

Für den Assay dürfen nur mit formalinhaltigen Fixiermitteln behandelte Gewebe verwendet werden. Durch Verwendung anderer Fixiermittel würde der Assay seine Gültigkeit verlieren.

Mit Gewebepreparaten, deren Dicke außerhalb des empfohlenen Bereichs liegt, wurde das System nicht getestet. Durch die Verwendung von Schnitten anderer Dicke verliert der Assay möglicherweise seine Gültigkeit.

Zelliniendaten

Zelllinie	Profil des Bond Oracle HER2 IHC System	HER2 Rezeptordichte pro Zelle*	Status der HER2 Genverstärkung ⁺	
			HER2 Kopienanzahl	HER2:Chr17 Genverhältnis
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

**Analyse der HER2 Rezeptordichte mithilfe von Durchflusszytometrie. ⁺Bestimmung des Status der HER2 Genverstärkung mithilfe von Dual Probe (HER2:Chromosom 17) FISH.*

Tabelle 5. Profil des HER2 Control Slide

Klinische Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und Dako Hercep Test

Im ersten Teil der Studie wurde die Eignung des Bond Oracle HER2 IHC System als Hilfsmittel bei der Entscheidung über eine Therapie mit Herceptin® (trastuzumab) untersucht. Die Studie war dafür konzipiert, die Konkordanz zwischen dem Bond Oracle HER2 IHC System und dem Dako HercepTest (dem Goldstandard für diesen Assay) zu ermitteln. Als Akzeptanzkriterium wurde eine Gesamtkonkordanz von mehr als 75 % zwischen den beiden Tests (mit einem 95 %-Konfidenzintervall (KI)) definiert.

Die Studie wurde als Blindstudie an zwei Standorten in den USA durchgeführt. Jedes der beiden Untersuchungslabors wurde mit formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Brustkrebsproben mit bekanntem HER2 Status ausgestattet. Die Fälle wurden in umgekehrter Reihenfolge aus den klinischen Archiven ausgewählt und repräsentierten den kontinuierlichen Zustrom von Fällen für klinische Tests in einer Histopathologieabteilung. Sie wurden unabhängig von anderen prognostischen und/oder prädiktiven Faktoren getestet, und es lag kein Bias in der Kohorte vor. In Labor 1 und Labor 2 wurden Kohorten von 160 bzw. 292 Proben getestet. In den einzelnen Kohorten waren die mehrdeutigen/positiven (2+, 3+) und negativen (0, 1+) Fälle (auf der Basis zuvor zugeordneter HER2 IHC Werte) in gleicher Anzahl vertreten, woraus sich eine Gesamtuntersuchungspopulation von 452 Proben ergab. Zwölf Proben wurden wegen nicht ausreichendem invasivem Tumorgewebe als ungeeignet eingestuft und aus der Studie entfernt. Weitere neun (9) Proben konnten aufgrund

von Gewebeablösung von der Objektträgeroberfläche nicht eingestuft werden, sodass sich die endgültige Untersuchungspopulation auf 431 Proben verringerte.

Alle Fälle wurde nach den Anweisungen des Herstellers (auf der Packungsbeilage) mit dem HercepTest gefärbt. Aufeinanderfolgende Schnitte von den einzelnen Fällen wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf einem Leica Biosystems BOND Färbeautomaten gefärbt. Die Verknüpfung mit den persönlichen Daten der Patienten wurde in allen Fällen aufgehoben. Zu jedem Fall lagen klinische Daten in Bezug auf Tumorgröße, Tumorstadium, Tumorgrad und Östrogenrezeptorstatus vor.

Alle gefärbten Objektträger wurden verblindet und von geschulten Beobachtern in zwei Labors auf Zufallsbasis (randomisiert) eingestuft. Bei der 2x2 Konkordanzanalyse wurden die Ergebnisse als negativ bewertet, wenn die Färbeintensität 0 oder 1+ betrug, und positiv bewertet, wenn die Werte 2+ oder 3+ betrug. Bei der 3x3 Konkordanzanalyse wurden die Ergebnisse bei einer Färbeintensität von 0 oder 1+ als negativ, bei einem Wert von 2+ als mehrdeutig und bei einem Wert von 3+ als positiv bewertet. Anschließend wurden die Daten auf Übereinstimmung der positiven und negativen Färbung analysiert.

2x2 Konkordanzergebnisse

Bei dieser primären Analyse werden die Ergebnisse der beiden Tests (Bond Oracle HER2 IHC System und Dako HercepTest) als negativ (0,1+) oder positiv (2+, 3+) eingestuft. Die Häufigkeiten von vier möglichen Kombinationen werden in einem 2x2-Tabellenformat dargestellt (siehe Tabelle 6). Anschließend wird die Gesamtkonkordanzhäufigkeit auf der Basis dieser 2x2-Tabelle mit einem 95 %-Konfidenzintervall (auf der Grundlage der binomischen Verteilung) ausgerechnet.

Die Nullhypothese (H_0), der die Erfolgskriterien entgegenstehen, besagt, dass die Konkordanz nicht größer als 75 % ist.

Die beobachtete Übereinstimmung bei 431 Proben in den beiden Tests zeigt in einer 2x2-Analyse eine Konkordanz von 92,34 % (398/431) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 89,42 % - 94,67 %. Diese Daten unterstützen die Ablehnung der Nullhypothese (H_0), dass die Übereinstimmung nicht mehr als 75 % (mit einem p-Wert < 0,0001) betrage.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen (Sensibilität) bzw. die Fähigkeit des Bond Oracle HER2 IHC System, die mithilfe des HercepTest als positiv klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Bond Oracle HER2 IHC System als auch vom HercepTest als positiv erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe des HercepTest als positiv klassifizierten Fälle), betrug 84,87 % (129/152) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 78,17 % - 90,16 %. Der Anteil der negativen Übereinstimmungen (Spezifität) bzw. die Fähigkeit des Tests, die mithilfe des HercepTest als negativ klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Bond Oracle HER2 IHC System als auch vom HercepTest als negativ erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe des HercepTest als negativ klassifizierten Fälle), betrug 96,42 % (269/279) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 93,51 % - 98,27 %.

		HercepTest		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ	269	23	292
	Positiv	10	129	139
	Gesamt	279	152	431

2x2 Konkordanz (95 %-KI) = 92,34 % (89,42 - 94,67 %); p < 0,0001

Tabelle 6. 2x2 Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und HercepTest

3x3 Konkordanzergebnisse

Die Daten wurden für die 3x3-Analyse als negativ (0 oder 1+), mehrdeutig (2+) oder positiv (3+) gruppiert und zeigten eine Konkordanz von 86,54 % (373/431) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 82,95 % - 89,62 %. Deshalb wurde die Nullhypothese (H_0), dass die Übereinstimmung nicht mehr als 75 % betrage, mit einem p-Wert $<0,0001$ abgelehnt.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen für 3+ (das heißt, der Anteil der sowohl vom Bond Oracle HER2 IHC System als auch vom HercepTest als 3+ positiv klassifizierten Proben an der Gesamtanzahl der mithilfe des HercepTests als 3+ positiv klassifizierten Fälle) in dieser Studie betrug 73,33 % (66/90) mit einem 95 %-KI von 62,97 % - 82,11 %. Der Anteil der negativen Übereinstimmungen betrug 96,42 % (269/279) mit einem 95 %-KI von 93,51 % - 98,27. Siehe Tabelle 7.

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

3x3 Konkordanz (95 %-KI) = 86,54 % (82,95 - 89,62 %); $p < 0,0001$

Tabelle 7. 3x3 Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und HercepTest

Die bei dieser Studie generierten Daten zeigen somit, dass das Bond Oracle HER2 IHC System aufgrund seiner hohen Konkordanz mit dem HercepTest zur Entscheidung über eine Therapie mit Herceptin® (trastuzumab) eingesetzt werden kann.

Klinische Konkordanz zwischen Bond Oracle HER2 IHC System und PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Teil 2 der Studie zielte darauf ab, die Konkordanz zwischen dem Bond Oracle HER2 IHC System und dem als Goldstandard für Gene Assessment Reflex Assays in Kombination mit HER2 Immunhistochemie geltenden Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit zu untersuchen.

Diese Studie wurde in denselben Labors mit derselben Kohorte wie Teil 1 durchgeführt. Alle Fälle wurden mit dem Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers auf der Packungsbeilage gefärbt. Aufeinanderfolgende Schnitte von den einzelnen Fällen wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf einem BOND Färbeautomaten (aus Teil 1 der Studie) gefärbt. Bei drei von 431 gefärbten Proben wurde wegen unzureichender Sondenhybridisierung kein Ergebnis erzielt, wodurch sich die Gesamtkohorte auf 428 Fälle verringerte.

Alle gefärbten Objektträger wurden in zwei Labors von geschulten Beobachtern eingestuft. Bei der 3x2-Konkordanzanalyse wurden die Ergebnisse als negativ eingestuft, wenn der HER2/CEP17-Genverstärkungsfaktor weniger als ($<$) 2,0 betrug, und positiv eingestuft, wenn er nach Zählung von 20 Tumorzellen größer oder gleich ($>$) 2,0 war.

3x2 Konkordanzergebnisse

Die beobachtete Übereinstimmung bei 428 Proben in den beiden Tests zeigt in einer 3x2-Analyse eine Konkordanz von 87,6 % (375/428) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 84 % - 90 %.

Der Anteil der positiven Übereinstimmungen (Sensibilität) bzw. die Fähigkeit des Bond Oracle HER2 IHC System, die mithilfe von PathVysion als positiv klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Bond Oracle HER2 IHC System als auch von PathVysion als positiv erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von PathVysion als positiv klassifizierten Fälle), betrug 93,8 % (61+30/97) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 86,8 % - 97,4 %.

Der Anteil der negativen Übereinstimmungen (Spezifität) bzw. die Fähigkeit des Tests, die mithilfe von PathVysion als negativ klassifizierten Fälle korrekt zu erkennen (das heißt, der Anteil der Proben, die sowohl vom Bond Oracle HER2 IHC System als auch von PathVysion als negativ erkannt wurden, an der Gesamtzahl der mithilfe von PathVysion als negativ klassifizierten Fälle), betrug 85,8 % (284/331) mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 81,6 % - 89,2 %. Siehe Tabelle 8.

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

Gesamtkonkordanz (95 %-KI) = 87,6 % (84 - 90 %)

Tabelle 8. 3x2-Konkordanz zwischen der Färbung mit dem Bond Oracle HER2 IHC System und dem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.

Immunreaktivität – Liste für normale Gewebe

Normalgewebetyp	Färbemuster	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Nebennieren	Negativ	Negativ
Gehirn, Kleinhirn	Negativ	Negativ
Brain, Großhirn	Negativ	Negativ
Mamma	Negativ	Negativ
Knochenmark	Negativ	Negativ
Kolon	Negativ	Negativ
Speiseröhre	Negativ	Negativ
Auge	Negativ	Negativ
Hypophyse	Mäßige zytoplasmatische Färbung bei Hypophysenzellen beobachtet (1/3)	Negativ
Niere	Negativ	Negativ
Kehlkopf	Negativ	Negativ
Leber	Negativ	Negativ
Lunge	Negativ	Negativ
Mesothel	Negativ	Negativ
Eierstock	Negativ	Negativ
Bauchspeicheldrüse	Negativ	Negativ
Nebenschilddrüse	Negativ	Negativ
Peripherer Nerv	Negativ	Negativ
Prostata	Negativ	Negativ
Speicheldrüse	Negativ	Negativ
Haut	Negativ	Negativ
Dünndarm	Negativ	Negativ
Milz	Negativ	Negativ
Magen	Schwache zytoplasmatische Färbung bei Magendrüsen beobachtet (2/3)	Negativ
Quergestreifter Muskel	Negativ	Negativ
Hoden	Negativ	Negativ
Thymus	Negativ	Negativ
Schilddrüse	Negativ	Negativ
Tonsille	Negativ	Negativ
Gebärmutterhals	Negativ	Negativ
Gebärmutter	Negativ	Negativ

Reproduzierbarkeitsstudie

Tests auf Präzision innerhalb eines Laufs/zwischen verschiedenen Läufen

Die Präzisionstests wurden bei Leica Biosystems, Newcastle Ltd. durchgeführt. Bei dem verwendeten Gewebe handelte es sich um einen von Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea) gelieferten formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tissue Micro Array (TMA), der sich aus 20 Gewebekernen mit einem Durchmesser von 4 mm aus invasiven Brustkarzinomen zusammensetzte. Die 20 Fälle wurden anhand zuvor zugewiesener HER2 Werte ausgewählt. Auf dieser Basis wurden x5 Fälle von HER2 3+, x5 Fälle von HER2 2+, x5 Fälle von HER2 1+ und x5 Fälle von HER2 0 einbezogen.

A. Tests auf Präzision innerhalb eines Laufs

Die Tests auf Präzision innerhalb eines Laufs wurden für das Bond Oracle HER2 IHC System mit insgesamt 40 aufeinanderfolgenden Schnitten aus einem TMA aus 20 invasiven Brusttumoren und 40 HER2 Control Slides durchgeführt. Alle Objektträger wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf dem BOND Färbeautomaten gefärbt. Die Schnitte wurden innerhalb eines zusammenhängenden Zeitraums mit einem Bond Oracle HER2 IHC System aus derselben Produktionscharge gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden verblindet und auf Zufallsbasis (randomisiert) von einem einzigen erfahrenen Beobachter im Hinblick auf die Präzision innerhalb eines Laufs beurteilt.

Eine Beurteilung der Objektträger aus der Intra-Run-Untersuchung ergab, dass 733/800 (91,63 %) Testdatenpunkte interpretiert werden konnten. 40 Datenpunkte wurden ausgeschlossen, weil nur DCIS-Gewebe vorhanden war, und weitere 27 Datenpunkte konnten wegen des Verlusts von invasivem Tumorgewebe (spezifisch für 3 Kerne) nicht interpretiert werden. Farbvariationen traten bei 61 (8,32 %) von 733 möglichen Färbereignissen auf. In 37 Fällen wurde eine Variation von 3+ zu 2+ (n = 20) und von 1+ zu 0 (n = 17) beobachtet, was somit in einer 2x2-Datenanalyse keine Veränderung von klinisch positiv zu klinisch negativ oder umgekehrt bedeuten würde. Die verbleibenden 24 (3,27 %) Fälle stellten eine Veränderung von klinisch negativ (0 oder 1+) zu klinisch positiv (2+ oder 3+) dar. Erfolgsrate = 96,7 % (95 % KI = 95,15 % - 97,81 %).

B. Test auf Präzision zwischen verschiedenen Läufen

Die Tests auf laufübergreifende Präzision wurden für das Bond Oracle HER2 IHC System mit insgesamt 24 aufeinanderfolgenden Schnitten aus einem TMA aus 20 invasiven Brusttumoren und 24 HER2 Control Slides durchgeführt. Alle Objektträger wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf dem BOND Färbeautomaten gefärbt. Die Objektträger wurden in 8 voneinander unabhängigen, im selben Labor bei drei verschiedenen Gelegenheiten durchgeführten Färbeläufen mit einem Bond Oracle HER2 IHC System aus derselben Produktionscharge beurteilt. Die gefärbten Schnitte wurden verblindet und auf Zufallsbasis (randomisiert) von einem einzigen erfahrenen Beobachter im Hinblick auf die Präzision zwischen verschiedenen Läufen beurteilt.

Eine Beurteilung der Objektträger aus der Inter-Run-Untersuchung ergab, dass 456/480 (95,00 %) Testdatenpunkte interpretiert werden konnten. 24 Datenpunkte konnten wegen des Verlusts von invasivem Tumorgewebe (spezifisch für 5 Kerne) nicht interpretiert werden. Farbvariationen traten bei 42 (9,21 %) von 456 möglichen Datenpunkten auf. In 30 Fällen wurde eine Variation von 3+ zu 2+ (n = 10) und von 1+ zu 0 (n = 20) beobachtet, was somit in einer 2x2-Datenanalyse keine Veränderung von klinisch positiv zu klinisch negativ oder umgekehrt bedeuten würde. Die verbleibenden 12 (2,63 %) Fälle stellten eine Veränderung von klinisch negativ (0 oder 1+) zu klinisch positiv (2+ oder 3+) dar. Erfolgsrate = 97,37 % (95 % KI = 95,90 % - 98,77 %).

C. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Zur Bestimmung der chargenübergreifenden Reproduzierbarkeit wurden 3 Chargen des

Bond Oracle HER2 IHC System bei 3 verschiedenen Gelegenheiten unter GMP-Bedingungen produziert und an 24 Brusttumorschnitten (24 Testdatenpunkten) aus vier verschiedenen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Geweblöcken (die den HER2 Färbeintensitäten 0, 1+, 2+ und 3+ entsprachen) und drei HER2 Control Slides (12 Kontrolldatenpunkten) getestet. Drei voneinander unabhängige Färbeläufe wurden im selben Labor bei drei verschiedenen Gelegenheiten durchgeführt, wobei jeweils eine separate Produktionscharge des Bond Oracle HER2 IHC System verwendet wurde. Alle Objektträger wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf dem BOND Färbeautomaten gefärbt. Die gefärbten Objektträger wurden verblindet und auf Zufallsbasis (randomisiert) von einem einzigen erfahrenen Beobachter im Hinblick auf die chargenübergreifende Reproduzierbarkeit beurteilt.

Eine Beurteilung der Objektträger (Tests und Kontrollen) aus der Charge-zu-Charge-Untersuchung ergab, dass 36/36 Datenpunkte interpretiert werden konnten. Bei den 36 Datenpunkten trat zwischen den drei verschiedenen Produktionschargen des Bond Oracle HER2 IHC System keine Färbevariation auf. Die Färbung mit dem Bond Oracle HER2 IHC System ist produktionschargenübergreifend konstant.

D. Reproduzierbarkeit von Labor zu Labor

Die Tests auf laborübergreifende Reproduzierbarkeit der mit dem Bond Oracle HER2 IHC System erzielten Ergebnisse wurden an 3 Standorten (Leica Biosystems Newcastle (Standort A) und zwei unabhängigen Labors (Standort B und C) mit insgesamt 192 Schnitten aus einem TMA von 20 invasiven Brusttumoren sowie 24 HER2 Control Slides durchgeführt. Von den 192 gefärbten TMA-Schnitten wurden 96 mit HER2 Primary Antibody und 96 mit HER2 Negative Control gefärbt. Alle Objektträger wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf dem BOND Färbeautomaten gefärbt. Die Objektträger wurden in 8 voneinander unabhängigen, an jedem der drei Standorte durchgeführten Färbeläufen mit einem Bond Oracle HER2 IHC System aus derselben Produktionscharge beurteilt. Die gefärbten Schnitte wurden verblindet und auf Zufallsbasis (randomisiert) von einem einzigen erfahrenen Beobachter bei Leica Biosystems, Newcastle im Hinblick auf die laborübergreifende Reproduzierbarkeit beurteilt.

Eine Beurteilung der Objektträger aus der laborübergreifenden Untersuchung ergab, dass 1477/1920 (76,93 %) Testdatenpunkte interpretiert werden konnten. 443 Testdatenpunkte konnten aus folgenden Gründen nicht interpretiert werden:

- Unzureichende Funktion des HER2 Control Slide in 2/24 Fällen, was zum Ausschluss von 2 Läufen/160 Testdatenpunkten führte. Dieses Ereignis trat einmal am Standort A und einmal am Standort B auf (80 Testdatenpunkte pro Standort ausgeschlossen).
- Abweichung vom Testplan an Standort C, wobei insgesamt 24 Objektträger nach der Färbung mit dem Bond Oracle HER2 IHC System manuell mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden. Dies führte zu übermäßiger Gegenfärbung der HER2 Kontrollobjektträger und der TMA-Testdatenpunkte, sodass 240 Datenpunkte ausgeschlossen wurden.
- Verlust invasiven Tumorgewebes mit Ausschluss von 23 Testdatenpunkten. Dieses Ereignis trat 23 mal am Standort A auf und war das direkte Ergebnis von Gewebeerlust im TMA-Block bei der Produktion der für diese Untersuchung erforderlichen 192 aufeinander folgenden TMA-Schnitte.
- Nicht interpretierbare Färbung aufgrund unzureichenden Spülens durch den BOND Färbeautomaten mit Ausschluss von 20 Datenpunkten.

Die Beurteilung der interpretierbaren Objektträger bei der Untersuchung der laborübergreifenden Präzision ergab, dass bei 79 von 1477 (5,28 %) möglichen Färbeereignissen eine Färbevariation auftrat. Dabei stellten 14/1477 (0,95 %) Ereignisse Variationen von 0 zu 1+ oder 2+ zu 3+ dar, was bei einer 2x2-Datenanalyse keiner Veränderung von klinisch positiv zu klinisch negativ oder umgekehrt entsprach. Erfolgsrate = 99,05 % (95 % KI = 98,42 % - 99,46 %). Von den 14 Färbeereignissen traten 5/1477

(0,34 %) bei Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Standort A), 8/1477 (0,54 %) am Standort B und 1/1477 (0,07 %) am Standort C auf.

Die restlichen 65/1477 (4,40 %) Färbereignisse zeigten Variationen von 2+ zu 1+ oder 2+ zu 0, was in einer 2x2-Datenanalyse einer Veränderung von klinisch positiv zu klinisch negativ oder umgekehrt entsprechen würde. Erfolgsrate = 95,6 % (95 % KI = 94,42 % - 96,54 %). Von den 65 klinisch signifikanten Veränderungen traten 11/65 (16,9 %) bei Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Standort A), 24/65 (36,9 %) am Standort B und 30/65 (46,1 %) am Standort C auf. Bei den klinisch signifikanten Veränderungen ergab sich in keinem Fall eine Veränderung von 3+ zu einem negativen Ergebnis (0 oder 1+) oder umgekehrt.

E. Reproduzierbarkeit von Beobachter zu Beobachter

40 Resektionsproben von auf Zufallsbasis ausgewählten Fällen von invasivem Brustkrebs, die eine gleichmäßige Verteilung der HER2 IHC Grade aufwiesen, wurden nacheinander geschnitten und Leica Biosystems, Newcastle (Standort A), Standort B und Standort C zur Färbung und Interpretation zur Verfügung gestellt. Die Schnitte wurden an den Standorten vor der Einstufung verblindet und randomisiert. Die Übereinstimmung zwischen verschiedenen Beobachtern an den beiden voneinander unabhängigen klinischen Standorten B und C betrug 87,5 % (95 %-KI = 73,3 % - 95,8 %). Die Übereinstimmung zwischen Standort B bzw. Standort C und Leica Biosystems Newcastle, Ltd betrug 92,5 % (95 %-KI = 79,6 % - 98,4 %) bzw. 85 % (95 %-KI = 70,1 % - 94,29 %). Die Analyse der Gesamtübereinstimmung zwischen den drei Beobachtern (A, B, C) ergab einen Wert von 82,50 %.

F. Reproduzierbarkeit von Gerät zu Gerät (BOND-MAX und BOND-III)

Die Tests auf geräteübergreifende Präzision wurden mit dem Bond Oracle HER2 IHC System an einem einzigen unabhängigen Standort in Europa durchgeführt. Die getesteten Proben wurden aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten ganzen Schnitten von Einhundertachtunddreißig (138) Fällen von invasivem Brustkrebs (Nadelkern und Resektionsproben) entnommen. Die Tests auf geräteübergreifende Reproduzierbarkeit wurden prospektiv am Laborstandort durchgeführt, wobei aufeinanderfolgende Schnitte auf BOND-MAX und BOND-III Plattformen gefärbt wurden. Drei (3) Fälle wurden aufgrund nicht verfügbaren Proben-/Tumorgewebes als ungeeignet eingestuft und aus der Studie ausgeschlossen.

Bei beiden Geräten wurden identische Chargennummern des Bond Oracle HER2 IHC System und der Reagenzien des BOND Geräts verwendet. Die Schnitte wurden retrospektiv gefärbt. Die Objektträger wurden am Untersuchungsstandort von einem einzigen erfahrenen Beobachter im Hinblick auf die plattformübergreifende Präzision beurteilt.

Die Auswertung der Objektträger aus den Tests zur geräteübergreifenden Präzision zeigte eine 2x2-Konkordanz zwischen positiv (2+, 3+) und negativ (0, 1+) von 94,2 % (130/138) mit

einem 95 %-KI von 88,9 - 97,5 % und eine 3x3 Konkordanz zwischen positiv (3+), mehrdeutig (2+) und negativ (0, 1+) von 87,0 % (120/138) mit einem 95 %-KI von 80,2 - 92,1 %.

		BOND-MAX		
		Negativ (0/1+)	Positiv (2/3+)	Gesamt
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	81
	Positiv (2/3+)	7	50	57
	Gesamt	87	51	138

Gesamtkonkordanz (95 %-KI) = 94,2 % (88,9 - 92,1 %)

Tabelle 10. 2x2-Konkordanz der Färbungen mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf den Plattformen BOND-MAX und BOND-III.

		BOND-MAX			
		Negativ (0/1+)	Mehrdeutig (2+)	Positiv (3+)	Gesamt
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	0	81
	Mehrdeutig(2+)	6	5	1	12
	Positiv (3+)	1	9	35	45
	Gesamt	87	15	36	138

Gesamtkonkordanz (95 %-KI) = 87,0 % (80,2 - 92,1 %)

Tabelle 11. 3x3-Konkordanz der Färbungen mit dem Bond Oracle HER2 IHC System auf den Plattformen BOND-MAX und BOND-III.

Die bei dieser Studie generierten Daten zeigen ein hohes Maß an Konkordanz zwischen den Systemen Leica Biosystems BOND-MAX und BOND-III bei Verwendung des Bond Oracle

Fehlerbehebung

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Fehlerbehebungsmaßnahme
Keine immunohistochemische Färbung	Färbelauf vor dem Abschluss abgebrochen	Prüfen Sie mithilfe der BOND Software, ob während des Färbelaufs Fehler gemeldet wurden, und beheben Sie sie nach den von der BOND Software ausgegebenen Anweisungen.
	Falsche Protokollauswahl	Stellen Sie sicher, dass im Färbeprotokollfeld des Dialogs "Add Slide" der Standardwert *IHC Protocol H ausgewählt ist.
	Unzureichende Entparaffinierung von Objektträgern	Stellen Sie sicher, dass der Modus *Dewax im Feld "Preparation" des Dialogs Add slide ausgewählt ist.
	Abgabe ungeeigneter Vorratsreagenzien	Stellen Sie sicher, dass alle BOND Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet und an den richtigen Positionen in das Gerät eingesetzt wurden.
	Kontamination der BOND Wash Solution mit Natriumazid	Verwenden Sie eine neue BOND Wash Solution in der geeigneten Konzentration.
Schwache spezifische immunohistochemische Färbung	Unzureichendes Epitop-Retrieval	Stellen Sie sicher, dass geeignete BOND Epitope Retrieval Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet wurden und dass die BOND software auf das richtige Epitop-Retrieval-Protokoll, *HIER 25 min with *ER1 (97), eingestellt ist.
	Unzureichende Fixierung oder Verarbeitung der Testprobe	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind.
	Das Bond Oracle HER2 IHC System wird nach Ablauf des Verfallsdatums verwendet.	Stellen Sie sicher, dass das Verfallsdatum des verwendeten Bond Oracle HER2 IHC System nicht überschritten ist.

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Fehlerbehebungsmaßnahme
Übermäßige spezifische immunhistochemische Färbung	Unzureichendes Epitop-Retrieval	Stellen Sie sicher, dass geeignete BOND Epitope Retrieval Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet wurden und dass die BOND Software auf das richtige Epitop-Retrieval-Protokoll, *HIER 25 min with *ER1 (97), eingestellt ist.
	Variable Fixierung	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind. Testen Sie den Fall nach Möglichkeit mit einem anderen Block erneut. Falls dies nicht möglich ist, werten Sie die Bereiche mit den besten Fixierungsmustern mit einem entsprechenden mit H&E gefärbten Schnitt aus.
Unspezifische Hintergrundfärbung	Abgabe ungeeigneter Vorratsreagenzien	Stellen Sie sicher, dass alle BOND Reagenzien den richtigen Vorratsbehältern zugeordnet und an den richtigen Positionen in das Gerät eingesetzt wurden.
	Unzureichende Entparaffinierung von Objektträgern	Stellen Sie sicher, dass der Modus *Dewax im Feld "Preparation" des Dialogs Add slide ausgewählt ist.
	Unspezifische immunhistochemische Kreuzreaktion in Gewebe	Informationen zur Kreuzreaktivität normaler Gewebe finden Sie in der Gebrauchsanleitung zum Bond Oracle HER2 IHC System (Tabelle 9).
	Unspezifische immunhistochemische Kreuzreaktion mit nekrotischen Gewebebereichen	Stellen Sie sicher, dass ein Fixiermittel auf Formalinbasis verwendet wird und dass die Verarbeitungsabläufe für die zu testende Probe geeignet sind. Testen Sie den Fall nach Möglichkeit mit einem anderen Block erneut. Falls dies nicht möglich ist, werten Sie die Bereiche mit den besten Fixierungsmustern mit einem entsprechenden mit H&E gefärbten Schnitt aus.
	Trocknungsartefakt nach Abschluss eines Färbelaufs	Wenn ein Objektträger-Färbelauf über Nacht durchgeführt werden soll, wird die Verwendung der BOND Funktion für verzögerten Start empfohlen. Stellen Sie sicher, dass während dieses Zeitraums ein ausreichendes Volumen an destilliertem oder entionisiertem Wasser zum Verteilen auf die Objektträger zur Verfügung steht, um ein Austrocknen zu verhindern.
	Schnitte wurden mithilfe von stärkehaltigen Zusätzen an die Objektträger geheftet	Verwenden Sie stärkefreie Objektträger (Leica BOND Plus Slides – Produktcode S21.2113 oder Apex BOND Slides - Produktcode 3800040).

Problem	Wahrscheinliche Ursache	Fehlerbehebungsmaßnahme
Gewebe hat sich von Patienten-/Kontrollobjektträger(n) gelöst	Verwendung des falschen Objektträgertyps oder unzureichende Dränage	Stellen Sie sicher, dass für Patienten-/Kontrollschnitte die richtigen Objektträger verwendet werden (Leica BOND Plus Slides – Produktcode S21.2113 oder Apex BOND Slides – Produktcode 3800040). Stellen Sie sicher, dass die Objektträger ausreichend entwässert und 12–18 Stunden (über Nacht) bei 37 °C inkubiert werden. Schnitte, die eine stärkere Haftung erfordern, können eine weitere Stunde bei 60 °C inkubiert werden.

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

Falls bei Verwendung des Bond Oracle HER2 IHC System Probleme auftreten, die nicht durch den Troubleshooting Guide (Tabelle 12) abgedeckt sind, wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Leica Biosystems oder an Ihren Fachhändler.

Quellen

1. Corbett IP, Henry JA, Angus B et al. NCL-CB11, A new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Pathology*. 1990; 161:15-25.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992-1003.
3. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285-9.
4. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165-72.
5. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255-63.
6. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825-31.
7. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14: 929-931.
8. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2): 108-115.
9. Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008
10. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
11. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990; 17: 234-247.
12. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087-1898: USA
13. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special Report:

Quality control in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology 1989 ;92: 836-43.

14. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene 1990; 5: 953-62.
15. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine 1983; 14: 767.
16. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: Immunohistochemistry, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
17. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology 1980; 73: 626-32.
18. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. Journal of Clinical Pathology. 2006.

Änderungen gegenüber der vorherigen Ausgabe

Gelieferte Komponenten, Symbolidentifizierung.

Ausgabedatum

16 Juli 2020

Symbolidentifizierung

	Chargenbezeichnung		Lagerung		Katalognummer
	In-vitro-Diagnostikum		Hersteller		Zerbrechlich
	eIFU - gebrauchsanleitung beachten		Ausreichend für <n> Tests		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
SN	Seriennummer	R_X Only	Nur verschreibungspflichtig		

HercepTest™ ist eine Marke und unterliegt Lizenzen von DakoCytomation, Denmark A/S
 Herceptin® ist eine Marke von Genentech, Inc. und F. Hoffmann-La Roche Ltd.