

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Instrukcja obsługi

Do użycia z zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemem do barwień BOND™ firmy Leica Biosystems.

Produkt z numerem katalogowym TA9145 umożliwia wykonanie 60 testów (150 szkiełek):
60 szkiełek badanych do barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody;
60 szkiełek badanych do barwienia kontrolą ujemną HER2 Negative Control;
15 HER2 Control Slides do barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody;
15 własnych kontroli dodatnich na tkankach przygotowanych w laboratorium do barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym 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

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie	4
Informacje podstawowe	4
Ekspresja HER2	5
Podsumowanie zgodności klinicznej	5
Procedura badania	5
Dostarczone składniki	6
Wskazówki dotyczące stosowania	6
Przechowywanie i trwałość	7
Przygotowanie preparatów	7
Ostrzeżenia i środki ostrożności	7
Procedura	8
A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane	8
B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany	8
C. Metodologia	8
D. Układ szkiełek	9
E. Kroki procedury	9
Kontrola jakości	11
HER2 Control Slides – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	12
Własny dodatni kontrolny materiał tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	13
Własny ujemny kontrolny składnik tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	13
Tkanka pacjenta – kontrola ujemna HER2 Negative Control	13
Tkanka pacjenta – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	13
Weryfikacja badania	14
Interpretacja barwienia – rak piersi	14
Uzasadnienie kolejności badania szkiełek	15
1. HER2 Control Slides – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	15
2. Własny dodatni kontrolny materiał tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody	15
3. Własny ujemny kontrolny składnik tkankowy – kontrola dodatnia HER2 Positive Control	15
4. Materiał tkankowy pobrany od pacjenta – barwiony kontrolą ujemną HER2 Negative Control	15
5. Materiał tkankowy pobrany od pacjenta – barwiony przeciwciałem pierwotnym HER2 Primary Antibody	15
Ograniczenia	15
A. Ograniczenia ogólne	15
B. Szczególne ograniczenia dla produktu	16
Informacje o linii komórkowej	17
Zgodność kliniczna pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a badaniem Dako HercepTest – rak piersi	18
Wyniki zgodności 2x2	18
Wyniki zgodności 3x3	19
Zgodność kliniczna pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a zestawem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit – rak piersi	20
Wyniki zgodności 3x2	20
Immunoreaktywność – normalny panel	21

Spis treści

Badanie odtwarzalności	22
Badanie precyzji w ramach cyklu i pomiędzy cyklami	22
A. Badanie precyzji w ramach cyklu	22
B. Badanie precyzji pomiędzy cyklami	22
C. Odtwarzalność serii do serii	23
D. Odtwarzalność pomiędzy laboratoriami	23
E. Odtwarzalność pomiędzy obserwatorami	24
F. Precyzja pomiędzy aparatami (BOND-MAX w porównaniu z BOND-III)	24
Wykrywanie i usuwanie usterek	26
Literatura	28

Przeznaczenie

Do diagnostyki in vitro

Bond Oracle HER2 IHC System jest półilościowym badaniem immunohistochemicznym (IHC) przeznaczonym do oznaczania statusu onkoproteiny HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 [receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2]) w materiale tkankowym zajęтым przez raka piersi lub gruczolakoraka żołądka (również połączenia żołądkowo-przelykowego) opracowanym do oceny histologicznej. Bond Oracle HER2 IHC System jest wskazany do użycia jako pomoc w ocenie pacjentów, u których rozważane jest podjęcie leczenia preparatem Herceptin® (trastuzumab) (patrz ulotka dołączona do opakowania preparatu Herceptin®).

Uwaga: wszyscy pacjenci w badaniach klinicznych badających preparat Herceptin® zostali wybrani na podstawie eksperymentalnych testów immunocytochemicznych przeznaczonych wyłącznie na użytek danego badania, tzw. Clinical Trial Assay (CTA). Żaden z pacjentów uczestniczących w tych badaniach nie został wybrany przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System porównano z badaniem Dako HercepTest™ na niezależnym zbiorze próbek i stwierdzono, że dostarcza wystarczająco zgodne wyniki, jak podano w Podsumowaniu zgodności klinicznej. Rzeczywistej zależności pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a wynikami klinicznymi dotychczas nie określono.

Wszyscy pacjenci w badaniach klinicznych badających preparat Herceptin® u chorych z zaawansowanym rakiem żołądka (ToGA) zostali wybrani przy użyciu badania Dako HercepTest. Żaden z pacjentów uczestniczących w tych badaniach nie został wybrany przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System. System Bond Oracle HER2 IHC System porównano z króliczym monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) firmy Ventana Medical Systems Inc. na niezależnym zbiorze próbek i stwierdzono, że dostarcza wystarczająco zgodne wyniki, jak podano w Podsumowaniu zgodności klinicznej (rak żołądka). Rzeczywistej zależności pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a wynikami klinicznymi dotychczas nie określono.

Podsumowanie i objaśnienie

Informacje podstawowe

System Bond Oracle HER2 IHC System obejmuje mysie monoklonalne przeciwciało przeciw HER2 (klon CB11). Klon CB11, pierwotnie opracowany przez zespół Corbett i wsp. (1) i wyprodukowany przez firmę Novocastra Laboratories Ltd (obecnie Leica Biosystems Newcastle Ltd), jest skierowany przeciw wewnątrzkomórkowej domenie onkoproteiny HER2.

U części pacjentów chorujących na raka piersi i raka żołądka występuje nadekspresja onkoproteiny HER2 w ramach procesu złośliwej transformacji i progresji nowotworu (2). Stwierdzono również, że status HER2 odgrywa ważną rolę w leczeniu raka żołądka (3). Nadekspresja onkoproteiny HER2 obserwowana w komórkach raka piersi sugeruje wykorzystanie HER2 jako celu w terapii przeciwciałami, natomiast wyniki uzyskane w badaniu ToGA wskazują jasno na to, że użycie preparatu Herceptin® w przypadku raka żołądka w skojarzeniu z chemioterapią stanowi skuteczną metodę leczenia, poprawiającą całkowity czas przeżycia pacjentów chorujących na raka żołądka o dodatnim statusie HER2 (4). Preparat Herceptin® jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym (5) o wysokim powinowactwie wiązania do onkoproteiny HER2. Stwierdzono, że preparat ten hamuje proliferację ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję onkoproteiny HER2 w środowisku in vitro, jak również in vivo (6–8).

Od pierwszej metody immunoperoksydazowej opisanej przez Nakane'a i Pierce'a (9) w dziedzinie immunohistochemii dokonano dużego postępu, poprawiając czułość stosowanych metod. Najnowszym osiągnięciem jest zastosowanie metody znakowania polimerów. Technologia ta jest stosowana zarówno w przypadku przeciwciał pierwszorzędowych, jak i immunohistochemicznych systemów detekcji (10). System detekcji Compact Polymer™

wykorzystywany przez system Bond Oracle HER2 IHC System należy do rodziny nowatorskich technologii do kontrolowanej polimeryzacji, które zostały opracowane specjalnie do przygotowania polimerycznych skoniugowanych przeciwciał sprzężonych z peroksydazą chrzanową (HRP, horseradish peroxidase). Ponieważ system Bond Oracle HER2 IHC System wykorzystuje technologię znakowania polimerów, problem nieswoistego endogennego barwienia biotyliny, mogący pojawić się w przypadku streptawidynowo-biotynowych systemów detekcji, tutaj nie występuje.

Ekspresja HER2

Onkoproteina HER2 wykazuje ekspresję na poziomie wykrywalnym przez metody immunohistochemiczne w maksymalnie 20% przypadków gruczolakoraka pobranego z różnych miejsc. Od 10% do 20% przypadków naciekającego przewodowego raka sutka (11) oraz 20% przypadków raka żołądka (12-14) wykazuje dodatni status onkoproteiny HER2. W 90% przypadków raka przewodowego in situ (DCIS, ductal carcinoma in situ) typu czopastego stwierdza się status dodatni (15), tak samo jak prawie we wszystkich przypadkach choroby Pageta brodawki sutkowej (16).

Podsumowanie zgodności klinicznej

System Bond Oracle HER2 IHC System został opracowany jako alternatywa do eksperymentalnych testów Clinical Trial Assay (CTA) wykorzystywanych w ramach badań klinicznych preparatu Herceptin®. Skuteczność systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zakresie oznaczania nadekspresji onkoproteiny HER2 w tkance piersiowej została oceniona w niezależnym badaniu, w którym porównano wyniki uzyskane w systemie Bond Oracle HER2 IHC System z wynikami uzyskanymi przy użyciu badania Dako HercepTest na podstawie 431 preparatów raka piersi pochodzących z USA. Żaden z preparatów nowotworu nie został pobrany od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych Herceptin®. Wyniki wykazywały zgodność na poziomie 92,34% w analizie 2x2 (95% przedziały ufności od 89,42% do 94,67%) oraz 86,54% w analizie 3x3 (95% przedziały ufności od 82,95% do 89,62%) pomiędzy powyższymi dwoma badaniami.

Skuteczność systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zakresie oznaczania nadekspresji onkoproteiny HER2 w komórkach gruczolakoraka żołądka (w tym również połączenia żołądkowo-przełykowego) została oceniona w niezależnym badaniu, w którym porównano wyniki uzyskane w systemie Bond Oracle HER2 IHC System z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem króliczego monoklonalnego przeciwciała pierwszorzędowego PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) firmy Ventana Medical Systems Inc. na podstawie 287 preparatów raka żołądka pochodzących z Chin. Żaden z preparatów nowotworu nie został pobrany od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych Herceptin®. Wyniki wykazywały zgodność na poziomie 95,12% w analizie 2x2 (95% przedziały ufności od 91,95% do 97,31%) oraz 89,90% w analizie 3x3 (95% przedziały ufności od 85,81% do 93,13%) odpowiednio pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System i badaniem PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) firmy Ventana.

Procedura badania

System Bond Oracle HER2 IHC System obejmuje składniki wymagane do wykonania procedury barwienia immunohistochemicznego materiału tkankowego utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie. Po inkubacji przy użyciu gotowego przeciwciała pierwszorzędowego HER2 Primary Antibody (klon CB11) system zastosuje gotową technologię znakowania polimerów Compact Polymer. Konwersja enzymatyczna następnie dodanego chromogenu prowadzi do utworzenia widocznego produktu reakcji w miejscu antygenowym. Skrawki tkanki można następnie wybarwić, odwodnić, prześwietlić i zamknąć. Wyniki interpretowane są pod mikroskopem świetlnym. Do weryfikacji cyklu barwienia dostarczane są szkiełka kontrolne obejmujące cztery linie ludzkich komórek raka piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Te cztery linie komórek demonstrują intensywność ekspresji onkoproteiny HER2 w skali 0, 1+, 2+ i 3+. Intensywność barwienia linii komórek skorelowana jest zarówno z ilością onkoproteiny receptorowej HER2 na jedną komórkę, jak i statusem amplifikacji genu HER2.

System Bond Oracle HER2 IHC System (nr katalogowy TA9145) jest przeznaczony do użycia z zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemem do barwień BOND firmy Leica Biosystems.

Dostarczone składniki

Poniżej wymienione materiały (tabela 1) wystarczą do wybarwienia 150 szkiełek (60 szkiełek badanych inkubowanych z przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody, 60 odpowiednich szkiełek badanych inkubowanych z kontrolą ujemną HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides inkubowanych z przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody oraz 15 własnych kontroli dodatnich na tkankach przygotowanych w laboratorium inkubowanych z przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody). Podana liczba testów wynika z zastosowania automatycznego dozowania 150 µl na jedno szkiełko. Zestaw zawiera materiały wystarczające do wykonania maksymalnie 15 poszczególnych cykli barwienia BOND.

HER2 Control Slides, (x15)	Skrawki linii ludzkich komórek raka piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie wykazujące intensywność ekspresji onkoproteiny HER2 w skali 0, 1+, 2+ i 3+ po wybarwieniu zgodnie z dostarczonym protokołem. Skrawki są całkowicie przylegające i nie wymagają dodatkowego ogrzewania.
HER2 Primary Antibody, 13,5 ml	Obejmuje gotowe mysie monoklonalne przeciwciało IgG oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa, klon CB11 oraz 0,35% ProClin™ 950.
HER2 Negative Control, 9 ml	Obejmuje gotowe mysie przeciwciało IgG o stężeniu odpowiadającym przeciwciału pierwszorzędowemu HER2 Primary Antibody oraz 0,35% ProClin™ 950.
Peroxide Block, 22,5 ml	Obejmuje 3–4% nadtlenek wodoru.
Post Primary, 22,5 ml	Królicze anti-mysie przeciwciało IgG (<10 µg/ml) w roztworze soli fizjologicznej buforowanym Tris obejmującym 10% (v/v) surowicę zwierzęcą oraz 0,09% ProClin™ 950.
Polymer, 22,5 ml	Kozie anti-królicze przeciwciało IgG związane z polimerem HRP (<25 µg/ml) w roztworze soli fizjologicznej buforowanym Tris obejmującym 10% (v/v) surowicę zwierzęcą oraz 0,09% ProClin™ 950.
DAB Part 1, 2,25 ml	Obejmuje 66 mM czterochlorowodoru 3,3'dwuaminobenzydyny w roztworze stabilizującym.
DAB Part B (x2), 22,5 ml	Obejmuje ≤0,1% (v/v) nadtlenek wodoru.
Hematoxylin, 22,5 ml	Obejmuje <0,1% hematoksylinę.

Tabela 1. Składniki systemu Bond Oracle HER2 IHC System

Wskazówki dotyczące stosowania

Wszystkie dostarczone odczynniki są przygotowane specjalnie do użycia z tym badaniem i zostały im przydzielone swoiste numery serii dla każdego systemu Bond Oracle HER2 IHC System. Aby wyniki badania były ważne, nie wolno stosować żadnych zamienników.

Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2 °C–8 °C. Nie zamrażać. Po użyciu natychmiast przenieść do temperatury 2 °C–8 °C. Niedotrzymanie wskazanych warunków spowoduje unieważnienie badania. Należy upewnić się, że nie minął jeszcze okres ważności używanego systemu Bond Oracle HER2 IHC System. Do znaków sygnalizujących skażenie i/lub niestabilność systemu Bond Oracle HER2 IHC System należą: zmętnienie roztworu, powstanie zapachu i obecność osadu. Warunki przechowywania inne niż wyżej określone muszą zostać sprawdzone przez użytkownika.

Przygotowanie preparatów

Wszystkie preparaty muszą być przygotowane w taki sposób, aby zachowana została tkanka do barwienia immunohistochemicznego. Do wszystkich preparatów należy użyć standardowych metod przygotowania materiału tkankowego (17).

Zaleca się, aby materiał tkankowy przygotowany był w utrwalaczu na bazie formaliny, przetworzony w rutynowy sposób i zatopiony w parafinie. Dla przykładu: wycinki powinny zostać rozcięte na bloczki o grubości 3–4 mm i utrwalone przez 18–24 godzin w 10% zubożonej formalinie. Następnie materiał tkankowy należy odwodnić w szeregu alkoholi, prześwietlić ksylenem i przepoić roztopioną parafiną utrzymywaną w temperaturze maksymalnie 60 °C. Preparaty tkankowe należy pokroić na skrawki 3–5 µm.

Jednocześnie należy przygotować szkiełka potrzebne do oceny onkoproteiny HER2 i weryfikacji guza. W celu utrzymania antygenowości skrawki tkanki zamknięte w szkiełkach (Leica BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113) należy wybarwić do 4–6 tygodni od pokrojenia, jeżeli przechowywane są w temperaturze pokojowej (18 °C–24 °C). Po pokrojeniu zaleca się inkubować skrawki przez 12–18 godzin (przez noc) w temperaturze 37 °C. Skrawki wymagające lepszego przyklejenia można inkubować przez dodatkową godzinę w temperaturze 60 °C.

W Stanach Zjednoczonych ustawa o poprawie klinicznych warunków laboratoryjnych Clinical Laboratory Improvement Act z roku 1988 w punkcie 42 CFR 493.1259(b) określa: „Laboratorium musi przechowywać wybarwione szkiełka przez co najmniej dziesięć lat od daty badania i bloczki z preparatami przez co najmniej dwa lata od daty badania”.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Wyłącznie dla profesjonalnych użytkowników.

Co najmniej jeden składnik produktu jest niebezpieczny.

Z zasady osobom poniżej 18 roku życia nie wolno pracować z tym produktem. Użytkownicy muszą otrzymać dokładne instrukcje na temat właściwej procedury roboczej, niebezpiecznych właściwości produktu i koniecznych środków ostrożności.

Jako objaw nadmiernej ekspozycji na działanie środka konserwującego ProClin™ 950 stosowanego w odczynnikach Oracle może pojawić się podrażnienie skóry i oczu oraz podrażnienie błon śluzowych i górnych dróg oddechowych. Stężenie ProClin™ 950 w tym produkcie wynosi do 0,35%. Roztwory te nie spełniają kryteriów Amerykańskiej Agencji Bezpieczeństwa i Zdrowia w Pracy (OSHA) dla niebezpiecznych substancji. Karta charakterystyki jest udostępniana na żądanie lub można ją pobrać ze strony www.LeicaBiosystems.com.

Z preparatami przed utrwaleniem i po utrwaleniu, jak również ze wszystkimi materiałami, które mają z nimi styczność, należy obchodzić się tak, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi i należy je utylizować, zachowując odpowiednie środki ostrożności.

Podczas odmierzania pipetą odczynników nie wolno nigdy zasysać ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub preparatów z wrażliwymi miejscami należy umyć dotknięte miejsca dużą ilością wody. Należy zasięgnąć porady lekarza. W sprawie utylizacji jakichkolwiek potencjalnie toksycznych składników należy zapoznać się z krajowymi lub miejscowymi przepisami.

Należy ograniczyć skażenie odczynników drobnoustrojami, ponieważ w przeciwnym razie może dojść do nasilenia barwienia nieswoistego.

Procedura

A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

- BOND Dewax Solution (nr katalogowy AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (nr katalogowy AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (nr katalogowy AR9590)
- Klasyczne rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii (np. etanol – absolutny i rozcieńczony)
- Ksylen (lub zamiennik ksylenu)
- Środek do zamykania preparatów
- Woda destylowana lub demineralizowana

B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

- BOND-MAX firmy Leica Biosystems oraz zaawansowany, w pełni zautomatyzowany system do barwień BOND-III
- BOND Universal Covertiles™ (nr katalogowy S21.2001, S21.4583 lub S21.4611)
- BOND Mixing Stations (numer katalogowy S21.1971)
- Ciepłarka, zdolna do utrzymania temperatury 60 °C
- Mikroskop świetlny (powiększenie obiektywu 4–40x)
- Szkiełka podstawowe (Leica BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113)
- Szkiełka nakrywkowe
- BOND Slide Label & Print Ribbon (nr katalogowy S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (nr katalogowy CS9100)

C. Metodologia

- Przed przystąpieniem do niniejszej metodologii użytkownik powinien być przeszkolony w całkowicie zautomatyzowanych metodach immunohistochemicznych BOND.
- Każdy badany skrawek przeznaczony do barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody będzie wymagał zastosowanie identycznego skrawka do barwienia kontrolą ujemną HER2 Negative Control. Skrawek oznaczony kontrolą ujemną pozwala na odróżnienie wybarwienia swoistego i nieswoistego w miejscu antygenowym. Każdy cykl barwienia BOND powinien obejmować szkiełko kontrolne HER2 Control Slide. Na końcu protokołu barwienia, jeżeli linie komórek nie wykazują prawidłowych wzorów barwienia (patrz Podręcznik do interpretacji wyników systemu Bond Oracle HER2 IHC System), cykl należy uznać za nieważny.

D. Układ szkiełek

Do każdego szkiełka należy użyć nowej pokrywy BOND Universal Covertile (nr katalogowy S21.2001, S21.4583 lub S21.4611). Użycie pokryw BOND Universal Covertiles, które zostały wcześniej wykorzystane do barwienia metodą immunohistochemiczną lub hybrydyzacji in situ, nie zostało zweryfikowane dla tego badania.

Układ tacy na szkiełka (tabela 2) zapewnia optymalną pracę systemu Bond Oracle HER2 IHC System i wykonanie pełnej puli 60 testów.

Pozycja szkiełka	Opis szkiełka	Odczynnik	Rodzaj tkanki	Ikona szkiełka
1	Przypadek 1	*HER2 Negative Control	Badana	
2	Przypadek 2	*HER2 Negative Control	Badana	
3	Przypadek 3	*HER2 Negative Control	Badana	
4	Przypadek 4	*HER2 Negative Control	Badana	
5	Przypadek 1	*HER2 Primary Antibody	Badana	
6	Przypadek 2	*HER2 Primary Antibody	Badana	
7	Przypadek 3	*HER2 Primary Antibody	Badana	
8	Przypadek 4	*HER2 Primary Antibody	Badana	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Dotatnia	
10	Własny kontrolny materiał tkankowy	*HER2 Primary Antibody	Dotatnia	

Tabela 2. Układ tacy ze szkiełkami, pokazujący rodzaj tkanki i odczynnik

E. Kroki procedury

Aby ułożyć tacę ze szkiełkami w układzie opisanym w tabeli 2, należy wykonać poniższe kroki. Wskazówki te należy czytać razem z podręcznikiem użytkownika BOND System User Manual.

1. Upewnić się, że pojemniki na odczynniki oraz zbiornik na niebezpieczne odpady w aparacie BOND są wystarczająco pojemne, aby wykonać wymagane cykle barwienia.
2. Upewnić się, że w pojemnikach na odczynniki jest wystarczająca ilość alkoholu, destylowanej lub demineralizowanej wody, roztworu do odparafinowania BOND Dewax Solution (dostarczanego w stanie gotowym do użycia), roztworu do odsłonięcia epitopów BOND Epitope Retrieval Solution 1 (dostarczanego w stanie gotowym do użycia) oraz roztworu płuczącego BOND Wash Solution (dostarczonego w postaci 10x koncentratu) do wykonania wymaganych cykli barwienia.

3. Upewnić się, że zainstalowana jest czysta stacja mieszania BOND Mixing Station.
4. Włączyć zaawansowany, w pełni zautomatyzowanym system do barwień BOND.
5. Włączyć sterownik BOND Controller podłączony do zaawansowanego, w pełni zautomatyzowanego systemu do barwień BOND.
6. Otworzyć oprogramowanie BOND.
7. W przypadku nowego systemu Bond Oracle HER2 IHC System zeskanować ręcznym czytnikiem kody kreskowe na tacy na odczynniki, aby wprowadzić system do inwentarza odczynników BOND.
8. Przejść do ekranu przygotowania szkiełek i kliknąć **Add case** (Dodaj przypadek).
9. Wprowadzić informacje o pierwszym przypadku. Upewnić się, że dozowana objętość ustawiona jest na **150 µl**, a protokół przygotowania ustawiony jest na ***Dewax**. Kliknąć OK.
10. Po podświetleniu przypadku na ekranie przygotowania szkiełek kliknąć **Add slide** (Dodaj szkiełko).
11. Najpierw dodać szkiełka badane pacjenta. Upewnić się, że rodzaj tkanki ustawiono na **Test tissue** (Tkanka badana).
12. Potwierdzić, że dozowana objętość wynosi **150 µL**, a protokół przygotowania ustawiony jest na ***Dewax**.
13. Wybrać wartości trybu barwienia **Single** (Pojedyncze) i **Oracle** nie klikać opcji **Oracle control** (Kontrola Oracle).
14. Wybrać procedurę **IHC**.
15. Z listy markerów wybrać kontrolę ujemną ***HER2 Negative Control**. W zakładce Protocol (Protokół) ustawi się automatycznie właściwy protokół barwienia (***IHC Protocol H**) oraz protokół HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Kliknąć **Add Slide** (Dodaj szkiełko). Utworzone zostanie szkiełko odczynnika do kontroli ujemnej.
17. Pozostając nadal w oknie dialogowym Add slide (Dodaj szkiełko), wybrać z listy markerów przeciwciała pierwszorzędowe ***HER2 Primary Antibody**. Domyślnie ustawione protokoły i wszystkie inne ustawienia pozostaną bez zmiany.
18. Kliknąć **Add Slide** (Dodaj szkiełko). Utworzone zostanie badane szkiełko.
19. Powtarzając procedurę opisaną w krokach 8–18, utworzyć wszystkie przypadki i badane szkiełka pacjentów.
20. Następnie utworzyć szkiełko kontrolne HER2. Można dodać je do ostatniego przypadku lub utworzyć dla szkiełek kontrolnych nowy przypadek, w zależności od praktyki stosowanej w laboratorium.
Ważne: do weryfikacji badania system Bond Oracle HER2 IHC System wymaga, aby szkiełko kontrolne HER2 dołączone było do każdego cyklu (tzn. tacy ze szkiełkami).
21. W oknie dialogowym Add slide (Dodaj szkiełko) ustawić rodzaj tkanki na **Positive tissue** (Tkanka dodatnia).
22. Kliknąć **Oracle control** (Kontrola Oracle).
23. Wybrać numer serii szkiełka kontrolnego HER2 z listy **Lot No** (Nr serii). Numer serii jest oznaczony na etykiecie szkiełka.
Ważne: szkiełko kontrolne HER2 musi pochodzić z tego samego systemu Bond Oracle HER2 IHC System, który będzie używany.
24. Wybrać z listy markerów przeciwciała pierwszorzędowe ***HER2 Primary Antibody**. Zachować dozowaną objętość, tryb barwienia i ustawienia procedury oraz protokołu.

25. Kliknąć **Add slide** (Dodaj szkiełko), aby dodać szkiełko kontrolne HER2.
26. Na koniec dodać szkiełko z własnym dodatkim kontrolnym materiałem tkankowym.
27. Usunąć zaznaczenie w polu **Oracle control** (Kontrola Oracle).
28. Wybrać z listy markerów przeciwciała pierwszorzędowe ***HER2 Primary Antibody**. Zachować dozowaną objętość, tryb barwienia i ustawienia procedury oraz protokołu. Rodzaj tkanki pozostawić jako **Positive tissue** (Tkanka dodatnia).
29. Kliknąć **Add Slide** (Dodaj szkiełko). W ten sposób zakończone zostanie tworzenie szkiełek.
30. Wydrukować etykiety dla szkiełek. Na wszystkich etykietach dla szkiełek Oracle widnieje nadruk „OC”. Na etykietce dla szkiełka kontrolnego HER2 widnieje również numer serii systemu Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Oznaczyć odpowiednio szkiełka.
32. Otworzyć pokrywy wszystkich pojemników systemu Bond Oracle HER2 IHC System i załadować tacę z odczynnikami do aparatu BOND.
33. Szkiełka umieścić na tacy na szkiełka w kolejności wyznaczonej w części D, tabeli 2. Nałożyć nowe pokrywy.
34. Załadować tacę ze szkiełkami do aparatu BOND i nacisnąć przycisk **Load/Unload** (Załaduj/Rozładuj).
35. Potwierdzić, że szkiełka zostały zeskanowane i kliknąć przycisk **Run [Play]** (Wykonaj) na ekranie stanu systemu.
36. Upewnić się, że w polu wskaźnika tacy wyświetlony jest napis **Proc [OK]** oraz numer partii i czas zakończenia.
37. Po zakończeniu cyklu nacisnąć przycisk **Load/Unload** (Załaduj/Rozładuj) i wyjąć tacę ze szkiełkami z aparatu BOND.
38. Zdjąć pokrywy i przepłukać szkiełka wodą demineralizowaną.
39. Skrawki odvodnić, prześwietlić i zamknąć.

Kontrola jakości

Różnice w utrwalaniu, obróbce i zatapianiu materiału tkankowego w laboratorium użytkownika mogą powodować znaczną zmienność w wynikach, dlatego oprócz szkiełek kontrolnych HER2 Control Slides dostarczonych przez firmę Leica Biosystems w ramach systemu Bond Oracle HER2 IHC System wymagane jest wykonywanie regularnych własnych kontroli. Należy zapoznać się z wytycznymi dot. kontroli jakości w ramach programu certyfikacji Certification Program for Immunohistochemistry Amerykańskiego Kolegium Patologów (CAP, College of American Pathologists); jak również z wytycznymi Amerykańskiego Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI; dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guide line (17) oraz raportem specjalnym Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18). Dodatkowo należy kierować się poniższą tabelą 3, opisującą rodzaj immunohistochemicznych kontroli jakości oraz ich przeznaczenie.

Próbka*	Opis	Barwienie przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody	Barwienie kontrolą ujemną HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	W stanie dostarczonym w ramach systemu Bond Oracle HER2 IHC System.	Kontroluje proces barwienia i określa ważność wyniku uzyskanego przez odczynnik.	
Własny dodatni kontrolny materiał tkankowy	Materiał tkankowy zawierający docelowy antygen. Idealną kontrolą jest słabo wybarwiająca się tkanka, pozwalająca na zdefiniowanie subtelnych zmian we wrażliwości przeciwciała pierwszorzędowego.	Kontroluje wszystkie kroki analizy. Weryfikuje przygotowanie materiału tkankowego i wynik barwienia w systemie Bond Oracle HER2 IHC System.	Wykrywanie nieswoistego barwienia tła
Własny ujemny kontrolny składnik tkankowy	Z założenia ujemny materiał tkankowy lub komórkowy (może znajdować się w tkance pacjenta lub dodatnim/ujemnym kontrolnym składniku tkankowym).	Wykrywanie nieswoistej reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórkowymi.	

*Utrwalana i obrabiana tak samo, jak preparat pacjenta.

Tabela 3. Immunohistochemiczne kontrole jakości i ich przeznaczenie

Kontrolny materiał tkankowy powinien być pobrany biopsyjnie lub chirurgicznie i jak najszybciej utrwalony w formalinie, obrobiony i zatopiony w parafinie w ten sam sposób, co próbki pacjenta. Z preparatami należy obchodzić się tak, aby zachować antygenowość materiału tkankowego do barwienia immunohistochemicznego. Do wszystkich preparatów należy użyć standardowych metod przygotowania materiału tkankowego (17).

HER2 Control Slides – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Każde z dostarczonych szkiełek kontrolnych HER2 Control Slides zawiera cztery rdzenie linii komórek ludzkich zajętych rakiem piersi utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie o intensywności barwienia 0, 1+, 2+ i 3+. Każdy cykl badania (czyli każda taca ze szkiełkami) musi obejmować jedno takie szkiełko. Poprawna ocena szkiełka kontrolnego HER2 Control Slide dostarczonego przez firmę Leica Biosystems oznacza ważność badania (patrz Podręcznik do interpretacji wyników systemu Bond Oracle HER2 IHC System). Szkiełka kontrolne HER2 Control Slides dostarczone w ramach systemu weryfikują tylko i wyłącznie działanie odczynników, a nie przygotowanie materiału tkankowego.

Własny dodatni kontrolny materiał tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Jeżeli stosowane są własne dodatnie kontrolne składniki tkankowe, powinny nimi być preparaty pobrane biopsyjnie lub chirurgicznie, które zostały jak najszybciej utrwalone, obrobione i zatopione w ten sam sposób, co próbki pacjenta. Dodatnie kontrole tkankowe są wyznacznikiem poprawnego przygotowania materiału tkankowego i ważności metody barwienia. W każdym cyklu badania powinien znajdować się co najmniej jeden dodatni składnik kontrolny. Dodatni skrawek kontrolny powinien wykazywać słabe wybarwienie, pozwalające na zdefiniowanie subtelnych zmian we wrażliwości przeciwciała pierwszorzędowego.

Uwaga: znane dodatnie kontrolne składniki tkankowe należy stosować wyłącznie do śledzenia poprawności wyników obrobionych tkanek razem z odczynnikami znakującymi, a NIE jako narzędzie do tworzenia swoistej interpretacji próbek pacjenta. Jeżeli dodatni kontrolny materiał tkankowy nie wykaże właściwego wybarwienia, wyniki uzyskane na podstawie preparatów pacjenta należy uznać za nieważne.

Jako odpowiedni własny materiał kontrolny można również zastosować wielotkankowy bloczek kontrolny obejmujący guzy reprezentujące wszystkie 4 stopnie ekspresji HER2.

Własny ujemny kontrolny składnik tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Jeżeli stosowane są własne ujemne składniki kontrolne, powinny nimi być świeżo pobrane preparaty biopsyjne lub chirurgicznie, które zostały jak najszybciej utrwalone, obrobione i zatopione w ten sam sposób, co próbki pacjenta. Zastosowanie tkanki kontrolnej, o której wiadomo, że posiada ujemny status onkoproteiny HER2, w każdym cyklu barwienia weryfikuje swoistość przeciwciała pierwszorzędowego i jest wyznacznikiem jakiegokolwiek nieswoistego barwienia ła. Bogactwo różnych rodzajów komórek obecnych we większości skrawków tkankowych oferuje ujemne wewnętrzne miejsca kontrolne (użytkownik powinien to sprawdzić). Normalne przewody piersiowe niezajęte nowotworem mogą posłużyć jako próby ważności badania. Jeżeli pojawi się swoiste wybarwienie ujemnej wewnętrznej tkanki kontrolnej, wyniki uzyskane na podstawie preparatów pacjenta należy uznać za nieważne.

Jako ujemne i dodatnie tkanki kontrolne można zastosować wielotkankowy bloczek kontrolny reprezentujący wszystkie 4 stopnie ekspresji HER2.

Tkanka pacjenta – kontrola ujemna HER2 Negative Control

Do każdego badania preparatu pacjenta zamiast przeciwciała pierwszorzędowego HER2 Primary Antibody należy użyć na zgodnym skrawku dostarczonej kontroli ujemnej HER2 Negative Control, aby ocenić nieswoiste wybarwienie i umożliwić dokładną interpretację swoistego wybarwienia onkoproteiny HER2 w miejscu antygenowym.

Tkanka pacjenta – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Intensywność wybarwienia należy ocenić w kontekście potencjalnego nieswoistego wybarwienia ła przy użyciu kontroli ujemnej HER2 Negative Control. Tak jak we wszystkich innych badaniach immunohistochemicznych wynik ujemny oznacza, że antygenu nie wykryto, co nie znaczy, że antygen nie jest obecny w badanych komórkach/tkankach. Szczegółowe informacje na temat immunoreaktywności systemu Bond Oracle HER2 IHC System podano w rozdziałach **Uzasadnienie kolejności badania szkiełek, Ograniczenia, Ocena wyników oraz Immunoreaktywność**.

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem jakiegokolwiek przeciwciała lub systemu do barwień w ramach procedury diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować swoistość przeciwciała poprzez jego oznaczenie na serii własnych tkanek o znanym dodatnim lub ujemnym profilu immunohistochemicznym. Należy kierować się powyższym opisem w rozdziale **Kontrola jakości** oraz wymogami dot. kontroli jakości w ramach programu certyfikacji Certification Program for Immunohistochemistry Amerykańskiego Kolegium Patologów (CAP, College of American Pathologists) i/lub wytycznymi Amerykańskiego Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI; dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17). Procedurę kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej serii przeciwciał lub w razie jakichkolwiek zmian w parametrach badania. Odpowiednimi próbkami do weryfikacji badania są próbki ludzkiego inwazyjnego (naciekającego) przewodowego raka sutka o znanym odczynie onkoproteiny HER2 od 0 do 3+ oraz innych tkanek o odpowiednio ujemnym odczynie.

Interpretacja barwienia – rak piersi

Do określenia ekspresji onkoproteiny HER2 należy ocenić tylko intensywność i wzór wybarwienia błony komórkowej, zgodnie ze skalą przedstawioną w tabeli 4. Ocenę szkiełek powinien wykonać patolog poprzez obserwację pod mikroskopem w polu jasnym. Do oceny wybarwienia immunohistochemicznego i wyniku odpowiedni jest obiektowy o 10x powiększeniu. Natomiast do potwierdzenia wyniku należy zastosować 20x–40x powiększenia obiektowy. Wybarwienie cytoplazmatyczne należy uznać za nieswoiste i nie należy go włączać w ocenę intensywności wybarwienia błony komórkowej (19). Jako pomoc do rozróżnienia stopnia wybarwienia 0, 1+, 2+ i 3+ można zastosować Podręcznik do interpretacji wyników systemu Bond Oracle HER2 IHC System, w którym przedstawiono wzorcowe ilustracje intensywności barwienia. Wynik należy przypisywać tylko do preparatów od pacjentów chorujących na naciekającą postać raka piersi. W przypadku obecności raka *in situ* i raka naciekającego w tym samym preparacie wynik należy przypisać tylko do składnika naciekającego.

Wzór barwienia immunohistochemicznego	Skala	Ocena
Nie zaobserwowano żadnego wybarwienia lub zaobserwowano wybarwienie błony komórkowej mniej niż 10% komórek nowotworowych.	0	Odczyn ujemny
Wykryto lekkie/ledwie zauważalne wybarwienie błony komórkowej więcej niż 10% komórek nowotworowych. Komórki są wybarwione tylko w części błony komórkowej.	1+	Odczyn ujemny
Wykryto słabe lub umiarkowane całkowite wybarwienie błony komórkowej więcej niż 10% komórek nowotworowych.	2+	Odczyn pośredni (słabo dodatni)
Wykryto intensywne całkowite wybarwienie błony komórkowej więcej niż 10% komórek nowotworowych.	3+	Odczyn mocno dodatni

Tabela 4. Interpretacja barwienia HER2 dla preparatów tkanki piersiowej

Wyniki barwienia przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System są interpretowane pod kątem ekspresji onkoproteiny HER2 następująco: odczyn ujemny, kiedy intensywność odczynu wynosi 0 lub 1+, pośredni (słabo dodatni), kiedy intensywność odczynu wynosi 2+, oraz mocno dodatni, kiedy intensywność odczynu wynosi 3+. System Bond Oracle HER2 IHC System nie służy jako źródło informacji prognostycznych ani dla pacjenta, ani dla lekarza; nie został on pod tym względem zweryfikowany. Aby móc określić ważność cyklu barwienia i umożliwić półilościową ocenę intensywności barwienia próbek materiału tkankowego, każdą ocenę wybarwienia szkiełek należy wykonywać w kolejności podanej poniżej.

Uzasadnienie kolejności badania szkiełek

Szkiełka należy badać w następującej kolejności:

1. HER2 Control Slides – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Ważne oznaczenie szkiełka kontrolnego Oracle HER2 Control Slide cechuje:

- Obecność intensywnego brązowego całkowitego wybarwienia błony komórkowej w kontrolnej linii komórek 3+ SK-BR-3.
- Obecność słabego do umiarkowanego brązowego całkowitego wybarwienia błony komórkowej w kontrolnej linii komórek 2+ MDA-MB-453.
- Obecność lekkiego/ledwie zauważalnego brązowego niecałkowitego wybarwienia błony komórkowej w kontrolnej linii komórek 1+ MDA-MB-175.
- Brak wybarwienia w kontrolnej linii komórek 0 MDA-MB-231.

Ważne: cechą charakterystyczną kontrolnej linii komórek 1+ MDA-MB-175 jest szczególnie schemat wzrostu, w którym komórki tworzą agregaty. Agregaty te tworzą ciągły rąbek szczoteczkowy w luminalnej części błony komórkowej rozciągający się wzdłuż całego agregatu komórek. Wybarwienie rąbka szczoteczkowego będzie bardziej intensywne niż pozostałej części błony komórkowej. Właściwy wzór wybarwienia 1+ onkoproteiny HER2 stanowi lekkie/ledwie zauważalne niecałkowite wybarwienia błony komórkowej. W tej linii komórek można również zauważyć punktowe wybarwienie typu „dot-like” w rejonie aparatu Golgiego.

2. Własny dodatni kontrolny materiał tkankowy – przeciwciało pierwszorzędowe HER2 Primary Antibody

Stwierdzenie OBECNOŚCI brązowego wybarwienia błony komórkowej odpowiadającego znanemu statusowi onkoproteiny HER2 wybranej kontroli dodatniej.

3. Własny ujemny kontrolny składnik tkankowy – kontrola dodatnia HER2 Positive Control

Stwierdzenie BRAKU OBECNOŚCI wybarwienia błony komórkowej. Ujemny kontrolny składnik tkankowy potwierdza brak reaktywności krzyżowej systemu detekcji z docelowymi komórkami/składnikami komórkowymi. Jeżeli pojawi się wybarwienie błony komórkowej ujemnego kontrolnego składnika tkankowego, wyniki uzyskane na podstawie preparatów pacjenta należy uznać za nieważne.

4. Materiał tkankowy pobrany od pacjenta – barwiony kontrolą ujemną HER2 Negative Control

BRAK OBECNOŚCI wybarwienia błony komórkowej weryfikuje swoiste oznaczenie docelowego antygenu przez przeciwciało pierwotne. Jakikolwiek inne brązowe wybarwienie widoczne w cytoplazmie preparatu oznaczonego kontrolą ujemną HER2 Negative Control, np. w tkance łącznej, leukocytach, erytrocytach lub tkance martwiczej, należy uznać za nieswoiste barwienie tła i odnotować.

5. Materiał tkankowy pobrany od pacjenta – barwiony przeciwciałem pierwotnym HER2 Primary Antibody

Stopnie ekspresji onkoproteiny HER2 są określone przez kryteria opisane w tabeli 4, 5 i 6 oraz w podręcznikach do interpretacji wyników systemu Bond Oracle HER2 IHC System.

Ograniczenia

A. Ograniczenia ogólne

Immunohistochemia jest wielostopniową metodą laboratoryjną przeznaczoną do pomocy w interpretacji i oznaczaniu cech histopatologicznych. Metoda ta wymaga specjalnego

przeszkolenia pod kątem wszystkich aspektów procedury badania (w tym wyboru właściwych odczynników, materiału tkankowego, utrwalania, obróbki i przygotowania szkiełek IHC) oraz interpretacji.

Barwienie immunohistochemiczne materiału tkankowego zależy jest od obchodzenia się z materiałem, jego utrwalenia i obróbki przed wykonaniem barwienia. Niewłaściwe utrwalanie, mrożenie, rozmrażanie, przepłukiwanie, suszenie, ogrzewanie, krojenie lub też skażenie innym materiałem tkankowym bądź płynem może doprowadzić do powstania artefaktów, pułapowania przeciwciał lub uzyskania fałszywie ujemnych wyników. Niespójność wyników może być spowodowana przez zastosowanie różnych metod utrwalania i zatapiania lub przez nieprawidłowości samego materiału tkankowego (21). Nadmierne lub niepełne barwienie może również zaburzyć poprawną interpretację wyników.

Wybarwienie nieswoiste, jeżeli jest obecne, ma zazwyczaj charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie może być widoczne również sporadyczne wybarwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać niedotkniętych komórek. Komórki martwicze lub zwyrodniałe wybarwiają się często nieswoiście (22). Wyniki fałszywie dodatnie mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez endogenne enzymy, takie jak pseudoperoxydaza (erytrocyty) lub endogenna peroxydaza (cytochrom C), w zależności od zastosowanego barwnika immunohistochemicznego.

Materiał tkankowy pobrany od pacjentów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B, zawierający antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg), może wykazywać nieswoiste wybarwienie peroxydazą chrzanową (23).

Powodem niespodziewanego wybarwienia immunohistochemicznego lub rozbieżności w wybarwieniu mogą być zmiany w stopniu ekspresji genów kodujących lub antygenów. Jakikolwiek zmiany w przewidywanych wzorach barwienia należy interpretować w kontekście wszystkich pozostałych badań diagnostycznych.

Interpretacja wybarwienia immunohistochemicznego powinna być uzupełniona przez badania morfologiczne i zastosowanie odpowiedniego materiału kontrolnego, a oceny wyniku powinien dokonać wykwalifikowany patolog z uwzględnieniem historii klinicznej pacjenta oraz wyników innych badań diagnostycznych.

Badanie (tzn. ocena adekwatności kontroli dodatnich i ujemnych) wraz z interpretacją wybarwienia immunohistochemicznego lub jego braku powinno być wykonane w odpowiednio akredytowanym/licencjonowanym laboratorium pod nadzorem odpowiednio wykwalifikowanego i doświadczonego patologa, który będzie odpowiedzialny za ogólną ocenę badania immunohistochemicznego oraz jego interpretację.

B. Szczegółne ograniczenia dla produktu

Ten produkt nie jest przeznaczony do użycia w cytometrii przepływowej i jego parametry robocze nie zostały określone dla tej metody.

W wyniku rozpadu antygenów w skrawkach tkankowych mogą pojawić się fałszywie ujemne wyniki. Szkiełka potrzebne do oceny onkoproteiny HER2 i do weryfikacji guza należy przygotować jednocześnie. W celu utrzymania antygenowości skrawki tkanki zamknięte w szkiełkach (Leica BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113) należy wybarwić do 4–6 tygodni od pokrojenia, jeżeli przechowywane są w temperaturze pokojowej (18 °C–24 °C). Po pokrojeniu zaleca się inkubować skrawki przez 12–18 godzin w temperaturze 37 °C. Skrawki wymagające lepszego przyklejenia można inkubować przez dodatkową godzinę w temperaturze 60 °C.

Pomiędzy hodowlami linii komórkowych wykorzystanych w ramach systemu Bond Oracle HER2 IHC System mogą występować minimalne naturalne rozbieżności w profilu immunohistochemicznym. Te naturalne rozbieżności wpisują się w dopuszczalny poziom

tolerancji jednostki biologicznej i nie mają wpływu na interpretację lub pracę systemu.

Charakterystyka linii komórkowych przy użyciu zarówno cytometrii przepływowej, jak i hybrydizacji in situ, jak zostało przedstawione w tabeli 7, podlega również naturalnym biologicznym rozbieżnościom. Opisano również rozbieżności techniczne i interpretacyjne w ocenie kontrolnych linii komórkowych przy użyciu fluorescencyjnej hybrydizacji in situ (24).

W ocenie szkiełek kontrolnych HER2 należy uwzględnić wszystkie obowiązujące terminy ważności. System Bond Oracle HER2 IHC System należy przechowywać w temperaturze 2 °C–8 °C. Nie zamrażać. Po użyciu natychmiast przenieść do temperatury 2 °C–8 °C. Niedotrzymanie wskazanych warunków spowoduje unieważnienie badania.

Nie wolno zastępować odczynników w ramach systemu Bond Oracle HER2 IHC System żadnymi innymi składnikami, w tym dostarczonymi przez firmę Leica Biosystems ani innych dostawców. Zastąpienie odczynników spowoduje unieważnienie badania.

Istotne jest, aby wszystkie kroki opisane w części C do E (Procedura) zostały wykonane w podanej kolejności. Niedotrzymanie wskazanej kolejności spowoduje unieważnienie badania.

Istotne jest, aby do badania stosowany był tylko materiał tkankowy utrwalony w utrwalaczu na bazie formaliny. Użycie jakiegokolwiek utrwalacza innego typu spowoduje unieważnienie badania.

Skrawki tkankowe pokrojone na inną niż zalecaną grubość nie zostały zweryfikowane. Użycie skrawków innej grubości spowoduje unieważnienie badania.

Informacje o linii komórkowej

Linia komórkowa	Profil systemu Bond Oracle HER2 IHC System	Ilość receptorów HER2 na jedną komórkę*	Status amplifikacji genu HER2 ⁺	
			Liczba kopii HER2	Stosunek HER2 do genów chromosomu 17
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

*Analiza ilości receptorów HER2 wykonana metodą cytometrii przepływowej. * Status amplifikacji genu HER2 oceniony metodą FISH przy użyciu podwójnej sondy (HER2:chromosom 17).

Tabela 5. Profil szkiełka kontrolnego HER2

Zgodność kliniczna pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a badaniem Dako HercepTest – rak piersi

W pierwszej części badania badano przydatność systemu Bond Oracle HER2 IHC System jako pomocy w określeniu leczenia w ramach terapii preparatem Herceptin® (trastuzumab). Badanie zostało zaprojektowane w celu zbadania zgodności pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System i testem Dako HercepTest, który uważany jest za złoty standard dla tego badania. Kryterium akceptacji zdefiniowano jako ogólną zgodność powyżej 75% pomiędzy obydwooma badaniami z 95% przedziałem ufności (CI, confidence interval).

Badanie przeprowadzona jako dwuośrodkowe badanie prowadzone metodą ślepej próby w ośrodkach w USA. Każdy ośrodek badawczy otrzymał próbki raka krwi utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie o znanym odczynie HER2. Badane przypadki zostały wybrane z archiwów klinicznych w odwrotnej, następującej po sobie kolejności, przedstawiającej przypadki kolejno napływające do badań klinicznych na oddziale histopatologii, i zostały przetestowane niezależnie od innych prognostycznych i/lub predykcyjnych czynników, bez wprowadzenia do kohorty stronniczości. W ośrodku nr 1 i ośrodku nr 2 przebadano kohorty zawierające odpowiednio 160 i 292 próbki. Każda kohorta obejmowała taką samą liczbę przypadków pośrednich/dodatnich (2+, 3+) i ujemnych (0, 1+) na podstawie wcześniej przydzielonego immunohistochemicznego odczynu HER2, co łącznie dało populację badania w liczbie 452 próbek. Dwanaście próbek uznano za nieodpowiednie z powodu braku wystarczającego naciekającego guza i usunięto je z badania. Kolejnych dziewięć próbek nie można było poddać ocenie z powodu odstawiania tkanki od powierzchni szkiełka, a więc końcowa populacja badania wynosiła 431 próbek.

Wszystkie przypadki poddano barwieniu przy użyciu badania HercepTest zgodnie z instrukcją producenta podaną w ulotce dołączonej do opakowania. Sekwencyjne skrawki dla każdego przypadku poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND firmy Leica Biosystems. We wszystkich przypadkach odizolowano unikatowe dane umożliwiające identyfikację pacjenta, pozostawiając tylko dane kliniczne o wielkości guza, stopniu zaawansowania guza, stopniu złośliwości guza i statusie receptorów estrogenowych.

Wszystkie barwione szkiełka zaślepiono i poddano zrandomizowanej ocenie przez przeszkolonych obserwatorów w dwu ośrodkach. W przypadku analizy zgodności 2x2 odczyn interpretowano jako ujemny, jeżeli intensywność wybarwienia oceniono na 0 lub 1+, i jako dodatni, jeżeli wynik wynosił 2+ lub 3+. W przypadku analizy zgodności 3x3 odczyn interpretowano jako ujemny, jeżeli intensywność wybarwienia oceniono na 0 lub 1+, jako pośredni, jeżeli wynik wynosił 2+, i jako dodatni, jeżeli wynik wynosił 3+. Dane poddano następnie analizie pod kątem zgody odczynów dodatnich i zgody odczynów ujemnych.

Wyniki zgodności 2x2

W ramach głównej analizy wyniki obydwu badań (Bond Oracle HER2 IHC System i Dako HercepTest) sklasyfikowano jako ujemne (0, 1+) lub dodatnie (2+, 3+). Częstotliwości czterech możliwych kombinacji przedstawiono w postaci tabelarycznej 2x2 (patrz tabela 8). Następnie obliczono współczynnik ogólnej zgodności na podstawie powyższej tabeli 2x2, któremu towarzyszył 95% dokładny przedział ufności (na podstawie rozkładu dwumianowego).

Hipoteza zerowa (H_0), której przeciwstawione są kryteria powodzenia, mówi że zgodność jest nie większa niż 75%.

Zaobserwowana zgoda dla 431 próbek pomiędzy dwoma badaniami poddanymi analizie 2x2 wykazuje zgodność 92,34% (398/431) z 95% przedziałem ufności 89,42% – 94,67%. Dane te opowiadają się za odrzuceniem hipotezy zerowej (H_0), mówiącej, że zgoda nie jest większa niż 75%, z wartością $p < 0,0001$.

Procentowa zgoda dodatnia (wrażliwość) lub zdolność systemu Bond Oracle HER2 IHC System do poprawnego oznaczenia dodatnich przypadków w badaniu HercepTest (odsetek preparatów o odczynie dodatnim zarówno w systemie Bond Oracle HER2 IHC System, jak i w badaniu HercepTest na wszystkie dodatnie przypadki w badaniu HercepTest) wynosiła 84,87% (129/152) z 95% przedziałem ufności 78,17% – 90,16%. Procentowa zgoda ujemna (swoistość) lub zdolność badania do poprawnego oznaczenia ujemnych przypadków w badaniu HercepTest (odsetek preparatów o odczynie ujemnym zarówno w systemie Bond Oracle HER2 IHC System, jak i w badaniu HercepTest na wszystkie dodatnie przypadki w badaniu HercepTest) wynosiła 96,42% (269/279) z 95% przedziałem ufności 93,51% – 98,27%.

		HercepTest		
		Odczyn ujemny	Dodatnia	Łącznie
System Bond Oracle HER2 IHC System	Odczyn ujemny	269	23	292
	Dodatnia	10	129	139
	Łącznie	279	152	431

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

Tabela 6. Zgodność 2x2 pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a badaniem HercepTest

Wyniki zgodności 3x3

Dane do analizy 3x3 sklasyfikowano jako ujemne (0 lub 1+), pośrednie (2+) lub dodatnie (3+), a stwierdzona zgodność wynosiła 86,54% (373/431) z 95% przedziałem ufności 82,95% – 89,62%. Dlatego hipoteza zerowa (H_0), mówiąca, że zgoda nie jest większa niż 75%, została odrzucona z wartością $p < 0,0001$.

Procentowa zgoda dodatnia 3+ (odsetek preparatów o odczynie dodatnim 3+ zarówno w systemie Bond Oracle HER2 IHC System, jak i w badaniu HercepTest na wszystkie dodatnie przypadki 3+ w badaniu HercepTest) w tym badaniu wynosiła 73,33% (66/90) z 95% przedziałem ufności 62,97% – 82,11%. Procentowa zgoda ujemna wynosiła 96,42% (269/279) z 95% przedziałem ufności 93,51% – 98,27%. Patrz tabela 9.

		HercepTest			Łącznie
		Odczyn ujemny (0 lub 1+)	2+	3+	
System Bond Oracle HER2 IHC System	Odczyn ujemny (0 lub 1+)	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	Łącznie	279	62	90	431

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

Tabela 7. Zgodność 3x3 pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a badaniem HercepTest

Podsumowując, dane wygenerowane w tym badaniu pokazują, że dzięki wysokiemu stopniu zgodności z badaniem HercepTest system Bond Oracle HER2 IHC System może być pomocny do określenia leczenia w terapii preparatem Herceptin® (trastuzumab).

Zgodność kliniczna pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a zestawem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit – rak piersi

Część druga badania została zaprojektowana w celu zbadania zgodności pomiędzy systemem Bond Oracle HER2 IHC System a zestawem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit firmy Abbott Molecular, który uważany jest za złoty standard badań referencyjnych do oceny ekspresji genów, stosowany razem z immunohistochemią HER-2.

Badanie zostało przeprowadzone w tych samych ośrodkach badawczych i na tej samej kohorcie co część 1. Wszystkie przypadki poddano barwieniu przy użyciu zestawu PathVysion HER-2 DNA Probe Kit firmy Abbott Molecular zgodnie z instrukcją producenta podaną w ulotce dołączonej do opakowania. Sekwencyjne skrawki dla każdego przypadku poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND (z części 1. badania klinicznego). Z łącznej liczby 431 przypadków poddanych barwieniu w trzech przypadkach nie uzyskano żadnych wyników z powodu niedostatecznej hybrydyzacji sondy, co oznacza, że ostateczna liczba przypadków w kohorcie wynosiła 428 przypadków.

Wszystkie barwione szkiełka poddano ocenie przez przeszkolonych obserwatorów w dwu ośrodkach badawczych. W przypadku analizy zgodności 3x2 odczyn interpretowano jako ujemny, jeżeli stopień amplifikacji genu HER2/CEP17 wynosił mniej niż (<) 2,0, i jako dodatni, jeżeli wynik ten był większy lub równy (>) 2,0 po osiągnięciu liczby komórek nowotworowych 20.

Wyniki zgodności 3x2

Zaobserwowana zgoda dla 428 próbek pomiędzy dwoma badaniami poddanymi analizie 3x2 wykazuje zgodność 87,6% (375/428) z 95% przedziałem ufności 84,1% – 90,6%.

Procentowa zgoda dodatnia (czułość) lub zdolność systemu Bond Oracle HER2 IHC System do poprawnego oznaczenia dodatnich przypadków w badaniu PathVysion (odsetek preparatów o odczynie dodatnim zarówno w systemie Bond Oracle HER2 IHC System, jak i w badaniu PathVysion na wszystkie dodatnie przypadki w badaniu PathVysion) wynosiła 93,8% (61+30/97) z 95% przedziałem ufności 87,0% – 97,7%.

Procentowa zgoda ujemna (swoistość) lub zdolność badania do poprawnego oznaczenia ujemnych przypadków w badaniu PathVysion (odsetek preparatów o odczynie ujemnym zarówno w systemie Bond Oracle HER2 IHC System, jak i w badaniu PathVysion na wszystkie dodatnie przypadki w badaniu PathVysion) wynosiła 85,8% (284/331) z 95% przedziałem ufności 81,6% – 89,4%. Patrz tabela 10.

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

Ogólna zgodność (95% CI) = 87,6% (84,1% – 90,6%)

Tabela 8. Zgodność 3x2 pomiędzy barwieniem przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System a zestawem PathVysion HER-2 DNA Probe Kit.

Immunoreaktywność – normalny panel

Rodzaj normalnej tkanki	Wzór barwienia	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Nadnercze	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Mózg, mózdzek	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Mózg, kresomózgowie	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Pierś	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Szpiak kostny	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Okreźnica	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Przełyk	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Oko	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Przysadka mózgowa	Umiarkowane wybarwienie cytoplazmatyczne obserwowane w komórkach przysadki (1/3)	Odczyn ujemny
Nerka	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Krtań	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Wątroba	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Płuco	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Mezotelium	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Jajnik	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Trzustka	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Przytarczyca	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Nerw obwodowy	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Prostata	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Ślinianka	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Skóra	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Jelito cienkie	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Śledziona	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Żołądek	Słabe wybarwienie cytoplazmatyczne obserwowane w gruczołach żołądkowych (2/3)	Odczyn ujemny
Tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Jądro	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Grasica	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Tarczyca	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Migdałek podniebienny	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Szyjka macicy	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny
Macica	Odczyn ujemny	Odczyn ujemny

Tabela 9. Odczyn normalnego panelu

Badanie odtwarzalności

Badanie precyzji w ramach cyklu i pomiędzy cyklami

Badanie precyzji wykonano w firmie Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Jako tkankę do badania wykorzystano wieloskładnikową mikromacierz tkankową (TMA, tissue micro array) utrwaloną w formalinie i zatopioną w parafinie, dostarczoną przez firmę Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), obejmującą 20 rdzeni tkanek zajętych przez naciekającego postać raka piersi o średnicy 4 mm. Tych 20 przypadków wybrano w oparciu o wcześniej przypisane odczyny HER2. W ten sposób do badania włączono x5 przypadków HER2 3+, x5 przypadków HER2 2+, x5 przypadków HER2 1+ i x5 przypadków HER2 0.

A. Badanie precyzji w ramach cyklu

Precyzję systemu Bond Oracle HER2 IHC System w ramach cyklu oceniano na łącznej liczbie 40 kolejnych skrawków odebranych z TMA obejmujących 20 naciekających guzów piersi oraz na 40 szkiełkach kontrolnych HER2. Wszystkie szkiełka poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND. Skrawki były barwione jednym ciągiem przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System z jednej serii produkcyjnej. W celu określenia precyzji w ramach cyklu barwione skrawki zaślepiono i poddano zrandomizowanej ocenie przez jednego doświadczonego obserwatora.

Ocena szkiełek w ramach cyklu wskazywała na to, że 733/800 (91,63%) badanych danych można zinterpretować. 40 danych wykluczono z powodu obecności tylko DCIS i kolejnych 27 danych nie można było zinterpretować z powodu utraty naciekającego guza (konkretnie w przypadku 3 rdzeni). Rozbieżności w wybarwieniu pojawiły się w 61 (8,32%) z 733 możliwych barwień. W 37 przypadkach wystąpiły rozbieżności w charakterze zmiany z 3+ na 2+ ($n = 20$) i 1+ na 0 ($n = 17$), co jednak w ocenie danych 2x2 nie stanowi zmiany z odczynu klinicznie dodatniego na ujemny lub odwrotnie. W pozostałych 24 (3,27%) przypadkach stwierdzono zmianę z odczynu klinicznie ujemnego (0 lub 1+) na odczyn klinicznie dodatni (2+ lub 3+). Wartość zaliczenia = 96,7% (95% CI = 95,15% – 97,81%).

B. Badanie precyzji pomiędzy cyklami

Precyzję systemu Bond Oracle HER2 IHC System pomiędzy cyklami oceniano na łącznej liczbie 24 kolejnych skrawków odebranych z TMA obejmujących 20 naciekających guzów piersi oraz na 24 szkiełkach kontrolnych HER2. Wszystkie szkiełka poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND. Szkiełka poddano ocenie w 8 osobnych cyklach wykonanych w tym samym laboratorium w trzech różnych momentach przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System z jednej serii produkcyjnej. W celu określenia precyzji pomiędzy cyklami barwione szkiełka zaślepiono i poddano zrandomizowanej ocenie przez jednego doświadczonego obserwatora.

Ocena szkiełek pomiędzy cyklami wskazywała na to, że 456/480 (95,00%) badanych danych można zinterpretować. 24 danych nie można było zinterpretować z powodu utraty naciekającego guza (konkretnie w przypadku 5 rdzeni). Rozbieżności w wybarwieniu pojawiły się w 42 (9,21%) z 456 możliwych danych. W 30 przypadkach wystąpiły rozbieżności w charakterze zmiany z 3+ na 2+ ($n = 10$) i 1+ na 0 ($n = 20$), co jednak w ocenie danych 2x2 nie stanowi zmiany z odczynu klinicznie dodatniego na ujemny lub odwrotnie. W pozostałych 12 (2,63%) przypadkach stwierdzono zmianę z odczynu klinicznie ujemnego (0 lub 1+) na odczyn klinicznie dodatni (2+ lub 3+). Wartość zaliczenia = 97,37% (95% CI = 95,90% – 98,77%).

C. Odtwarzalność serii do serii

W celu określenia odtwarzalności serii do serii wyprodukowano 3 serie systemu Bond Oracle HER2 IHC System zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania w 3 różnych momentach i oceniono je przy użyciu 24 skrawków guza piersi (24 danych badanych) odjętych z czterech różnych blozków tkankowych utwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (o intensywności barwienia HER2 0, 1+, 2+ i 3+) oraz trzech szkiełek kontrolnych HER2 Control Slides (12 danych kontrolnych). Wykonano trzy oddzielne cykle w jednym laboratorium w trzech różnych momentach, a do każdego cyklu wykorzystano inną serię produkcyjną systemu Bond Oracle HER2 IHC System. Wszystkie szkiełka poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND. W celu określenia odtwarzalności serii do serii barwione szkiełka zaślepiono i poddano zrandomizowanej ocenie przez jednego przeszkolonego obserwatora.

Ocena szkiełek (badanych i kontrolnych) serii do serii wskazywała na to, że 36/36 danych można zinterpretować. W ramach tych 36 danych nie stwierdzono żadnych rozbieżności w barwieniu pomiędzy trzema różnymi seriami produkcyjnymi systemu Bond Oracle HER2 IHC System. Barwienie przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System jest spójne pomiędzy różnymi seriami produkcyjnymi.

D. Odtwarzalność pomiędzy laboratoriami

Odtwarzalność systemu Bond Oracle HER2 IHC System pomiędzy laboratoriami oceniano w 3 ośrodkach: Leica Biosystems Newcastle Ltd (ośrodek A) oraz dwóch niezależnych laboratoriach (ośrodek B i C) na łącznej liczbie 192 skrawków odebranych z TMA obejmujących 20 naciekających guzów piersi oraz na 24 szkiełkach kontrolnych HER2. Z łącznej liczby 192 skrawków TMA poddanych barwieniu 96 skrawków oznaczono przeciwciałem pierwszorzędowym HER2 Primary Antibody i 96 skrawków odczynnikiem HER2 Negative Control. Wszystkie szkiełka poddano barwieniu przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND. Szkiełka poddano ocenie w 8 osobnych cyklach wykonanych w każdym z trzech różnych ośrodków badawczych przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System z jednej serii produkcyjnej. W celu określenia odtwarzalności pomiędzy laboratoriami barwione szkiełka zaślepiono i poddano zrandomizowanej ocenie przez jednego doświadczanego obserwatora w laboratorium firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd.

Ocena szkiełek pod kątem odtwarzalności pomiędzy laboratoriami wskazywała na to, że 1477/1920 (76,93%) badanych danych można zinterpretować. 443 badanych danych nie można było zinterpretować z powodu:

- niewłaściwego wyniku szkiełka kontrolnego HER2 w 2/24 przypadków, co spowodowało konieczność usunięcia 2 cykli/160 badanych danych. Do tego zdarzenia doszło raz w ośrodku A i raz w ośrodku B (usunięto 80 badanych danych na ośrodek badawczy);
- odstępstwa od planu badania w ośrodku C, kiedy łącznie 24 szkiełka wybarwiono ręcznie hematoksyliną po poddaniu barwieniu w systemie Bond Oracle HER2 IHC System. Doprowadziło to do nadmiernego wybarwienia zarówno szkiełek kontrolnych HER2, jak i badanych danych TMA, co oznaczało konieczność usunięcia 240 danych;
- utruty naciekającego guza, co oznaczało konieczność usunięcia 23 badanych danych. Do tego zdarzenia doszło w 23 przypadkach w ośrodku A w następstwie utraty tkanki w bločku TMA podczas produkcji 192 kolejnych skrawków TMA wymaganych do wykonania badania;
- niemożliwości interpretacji wybarwienia z powodu niedostatecznego przepłukania w zaawansowanym, w pełni zautomatyzowanym systemie do barwień BOND, co oznaczało konieczność usunięcia 20 danych.

Ocena pod kątem precyzji pomiędzy laboratoriami szkiełek umożliwiającą interpretację wskazywała na to, że rozbieżności w wybarwieniu pojawiły się w 79 (5,28%) z 1477 możliwych barwień. Z tego 14/1477 (0,95%) przypadków stanowiło zmianę z 0 na 1+ lub z 2+ na 3+, co w ocenie danych 2x2 nie oznacza zmiany z odczynu klinicznie dodatniego na ujemny lub odwrotnie. Wartość zaliczenia = 99,05% (95% CI = 98,42% – 99,46%). Z tych 14 barwień 5/1477 (0,34%) barwień wykonano w laboratorium firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd (ośrodek A), 8/1477 (0,54%) w ośrodku B i 1/1477 (0,07%) w ośrodku C.

Pozostałych 65/1477 (4,40%) przypadków wykazywało zmianę z 2+ na 1+ lub z 2+ na 0+, co w ocenie danych 2x2 oznaczałoby zmianę z odczynu klinicznie dodatniego na ujemny lub odwrotnie. Wartość zaliczenia = 95,6% (95% CI = 94,42% – 96,54%). Z łącznej liczby 65 klinicznie istotnych zmian 11/65 (16,9%) zdarzyło się przed oceną odczynu zaślepione i zrandomizowane. Zgoda pomiędzy obserwatorami w dwóch niezależnych ośrodkach klinicznych – ośrodkiem B i ośrodkiem C – wynosiła 87,5% (95% CI = 73,3% – 95,8%). Zgoda pomiędzy ośrodkiem B i ośrodkiem C a laboratorium firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd wynosiła odpowiednio 92,5% (95% CI = 79,6% – 98,4%) i 85% (95% CI = 70,1% – 94,29%). Analiza całkowitej zbieżności pomiędzy wszystkimi trzema obserwatorami (A, B, C) wynosi 82,50%.

E. Odtwarzalność pomiędzy obserwatorami

40 losowo wybranych przypadków naciekającego raka piersi, zapewniających równy rozkład wszystkich odczynów IHC HER2 (wycinki), zostało kolejno pokrojonych i dostarczonych do firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd (ośrodek A), ośrodka B i ośrodka C do barwienia interpretacji. W każdym ośrodku skrawki zostały przed oceną odczynu zaślepione i zrandomizowane. Zgoda pomiędzy obserwatorami w dwóch niezależnych ośrodkach klinicznych – ośrodkiem B i ośrodkiem C – wynosiła 87,5% (95% CI = 73,3% – 95,8%). Zgoda pomiędzy ośrodkiem B i ośrodkiem C a laboratorium firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd wynosiła odpowiednio 92,5% (95% CI = 79,6% – 98,4%) i 85% (95% CI = 70,1% – 94,29%). Analiza całkowitej zbieżności pomiędzy wszystkimi trzema obserwatorami (A, B, C) wynosi 82,50%.

F. Precyzja pomiędzy aparatami (BOND-MAX w porównaniu z BOND-III)

Badanie precyzji pomiędzy aparatami przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System wykonano w jednym niezależnym europejskim ośrodku badawczym. Badane próbki pochodziły z utrwalonych formaliną, zatopionych w parafinie całych sekcji z sto trzydzieści osiem (138) przypadków inwazyjnego raka piersi (okazy resekcji). Badanie pomiędzy aparatami wykonano metodą prospektywną w ramach ośrodka badawczego; kolejne skrawki barwiono na platformach BOND-MAX i BOND-III. Trzy przypadki uznano za nieodpowiednie z powodu dostępności próbki/guza i zostały usunięte z badania.

W każdym aparacie wykorzystano identyczne numery serii systemu Bond Oracle HER2 IHC System oraz dodatkowych odczynników do aparatu BOND. Skrawki barwiono retrospektywnie. W celu określenia precyzji pomiędzy aparatami szkiełka poddane zostały interpretacji w ośrodku badawczym przez jednego doświadczzonego obserwatora.

Ocena szkiełek pod kątem precyzji pomiędzy aparatami wykazała zgodność 2x2 pomiędzy odczynami dodatnimi (2+, 3+) i odczynami ujemnymi (0, 1+) na poziomie 94,2% (130/138) z 95% przedziałem ufności 88,9 – 97,5% i zgodność 3x3 pomiędzy odczynami dodatnimi (3+), pośrednimi (2+) i ujemnymi (0, 1+) na poziomie 87,0% (120/138) z 95% przedziałem ufności 80,2 – 92,1%.

		BOND-MAX		
		Odczyn ujemny (0/1+)	Odczyn dodatni (2/3+)	Łącznie
BOND-III	Odczyn ujemny (0/1+)	80	1	81
	Odczyn dodatni (2/3+)	7	50	57
	Łącznie	87	51	138

Ogólna zgodność (95% CI) = 87,0% (88,9% – 97,5%)

Tabela 10. Zgodność 2x2 barwienia przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System na platformie BOND-MAX w porównaniu z platformą BOND-III.

		BOND-MAX			
		Odczyn ujemny (0/1+)	Odczyn pośredni (2+)	Odczyn dodatni (3+)	Łącznie
BOND-III	Odczyn ujemny (0/1+)	80	1	0	81
	Odczyn pośredni (2+)	6	5	1	12
	Odczyn dodatni (3+)	1	9	35	45
	Łącznie	87	15	36	138

Ogólna zgodność (95% CI) = 87,0% (80,2% – 92,1%)

Tabela 11. Zgodność 3x3 barwienia przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System na platformie BOND-MAX w porównaniu z platformą BOND-III.

Podsumowując, dane wygenerowane w tym badaniu pokazują wysoki stopień zgodności pomiędzy aparatem BOND-MAX i BOND-III firmy Leica Biosystems w ramach oceny przy użyciu systemu Bond Oracle HER2 IHC System.

Wykrywanie i usuwanie usterek

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Działanie zaradcze
Brak wybarwienia immunohistochemicznego	Cykl przerwano przed zakończeniem	Posługując się oprogramowaniem BOND, potwierdzić obecność jakichkolwiek błędów zgłaszanych podczas cyklu barwienia i rozwiązać problem zgodnie z poleceniami oprogramowania BOND.
	Wybór niewłaściwego protokołu	Upewnić się, że w polu Staining protocol (Protokół barwienia) w oknie dialogowym Add slide (Dodaj szkiełko) widnieje ustawienie domyślne *IHC Protocol H .
	Nieodpowiednie odparafinowanie szkiełek	Upewnić się, że w polu Preparation (Przygotowanie) w oknie dialogowym Add slide (Dodaj szkiełko) ustawiony jest tryb *Dewax .
	Dozowanie niewłaściwych odczynników z pojemników	Upewnić się, że wszystkie odczynniki BOND zostały przydzielone do odpowiednich pojemników i umieszczone we właściwych pozycjach na aparacie.
	Skażenie roztworu płuczącego BOND Wash Solution azydkiem sodu	Użyć świeżo przygotowanego roztworu płuczącego BOND Wash Solution o odpowiedniej mocy działania.
Słabe swoiste wybarwienie immunohistochemiczne	Niewłaściwe odsonięcie epitopów	Upewnić się, że właściwe odczynniki BOND Epitope Retrieval zostały przydzielone do odpowiednich pojemników i że w oprogramowaniu BOND ustawił się właściwy domyślny protokół odsonięcia epitopów – *HIER 25 min with *ER1 (97) .
	Niewłaściwe utrwalenie lub niewłaściwa obróbka badanego preparatu	Upewnić się, że zastosowano utrwalacz na bazie formaliny i że harmonogramy obróbki są odpowiednie dla badanego preparatu.
	System Bond Oracle HER2 IHC System stosowany jest po upływie okresu ważności	Upewnić się, że nie minął jeszcze okres ważności używanego systemu Bond Oracle HER2 IHC System.
Nadmierne swoiste wybarwienie immunohistochemiczne	Niewłaściwe odsonięcie epitopów	Upewnić się, że właściwe odczynniki BOND Epitope Retrieval zostały przydzielone do odpowiednich pojemników i że w oprogramowaniu BOND ustawił się domyślny protokół – *HIER 25 min with ER1 (97) .
	Rozbieżności w utrwalaniu	Upewnić się, że zastosowano utrwalacz na bazie formaliny i że harmonogramy obróbki są odpowiednie dla badanego preparatu. Jeżeli to możliwe, powtórzyć oznaczenie przy użyciu innego bloczka. Jeżeli taka opcja nie jest możliwa, ocenić obszary wykazujące najlepsze utrwalenie w skojarzeniu z odpowiednim skrawkiem wybarwionym przeglądowo.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Działanie zaradcze
Nieswoiste wybarwienie tła	Dozowanie niewłaściwych odczynników z pojemników	Upewnić się, że wszystkie odczynniki BOND zostały przydzielone do odpowiednich pojemników i umieszczone we właściwych pozycjach na aparacie.
	Nieodpowiednie odparafinowanie szkiełek	Upewnić się, że w polu Preparation (Przygotowanie) w oknie dialogowym Add slide (Dodaj szkiełko) ustawiony jest tryb *Dewax .
	Nieswoista immunohistochemiczna reakcja krzyżowa w materiale tkankowym	Posłużyć się opisem reaktywności krzyżowej normalnej tkanki dla systemu Bond Oracle HER2 IHC System (patrz tabela 13).
	Nieswoista immunohistochemiczna reakcja krzyżowa z obszarami tkanki martwiczej	Upewnić się, że zastosowano utrwalacz na bazie formaliny i że harmonogramy obróbki są odpowiednie dla badanego preparatu. Jeżeli to możliwe, powtórzyć oznaczenie przy użyciu innego bloczka. Jeżeli taka opcja nie jest możliwa, ocenić obszary wykazujące najlepsze utrwalenie w skojarzeniu z odpowiednim skrawkiem wybarwionym przeglądowo.
	Zasychający artefakt po zakończeniu cyklu barwienia	Jeżeli szkiełka mają być badane w cyklu nocnym, zalecane jest użycie funkcji opóźnionego startu systemu BOND. Upewnić się, w aparacie znajduje się wystarczająco dużo wody destylowanej lub demineralizowanej, która będzie w tym czasie dozowana na szkiełka, aby nie wyschły.
	Skrawki przyklejone do szkiełek przy pomocy dodatków skrobiowych	Użyć szkiełek bez dodatków skrobiowych (np. Leica BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113)
Tkanka odklejona od szkiełka pacjenta / szkiełka kontrolnego	Użycie szkiełek niewłaściwego rodzaju lub nieodpowiednie wysuszenie skrawków	Upewnić się, że do skrawków pacjenta / skrawków kontrolnych zastosowano odpowiednie szkiełka (np. Leica BOND Plus Slides – nr katalogowy S21.2113). Upewnić się, że szkiełka zostały odpowiednio wysuszone i zostały poddane inkubacji przez 12–18 godzin (przez noc) w temperaturze 37 °C. Skrawki wymagające lepszego przyklejenia można inkubować przez dodatkową godzinę w temperaturze 60 °C.

Tabela 12. Przewodnik do wykrywania i usuwania usterek systemu Bond Oracle HER2 IHC System.

W razie pojawienia się jakichkolwiek problemów związanych z systemem Bond Oracle HER2 IHC System, które nie zostały opisane w przewodniku do wykrywania i usuwania usterek (patrz tabela 16), należy zwrócić się o pomoc do dystrybutora lub miejscowego działu pomocy technicznej firmy Leica Biosystems.

Literatura

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. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. at. 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).
4. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab 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
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Bang YJ et al. Poster 4526 presented at the 44th ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, USA, 30 May–3 June 2008.
13. 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. Nadjj, 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.

Poprawki do poprzedniego wydania

Precyzja pomiędzy aparatami (BOND-MAX w porównaniu z BOND-III).

Data publikacji

22 lutego 2017

Identyfikacja symboli

	Numer partii		Przechowywanie		Numer katalogowy
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Wytwórca		Ostrożnie, kruche
	Należy zapoznać się z instrukcją stosowania		Zawartość wystarczająca do wykonania <n> oznaczeń		Data ważności RRRR-MM-DD
SN	Numer seryjny				

HercepTest™ jest znakiem towarowym i produktem licencjonowanym firmy DakoCytomation, Denmark A/S

Herceptin® jest znakiem towarowym firmy Genentech, Inc. oraz firmy F. Hoffmann-La Roche Ltd.