

Инструкции по использованию Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Для использования на полностью автоматизированной, улучшенной системе окрашивания Leica Biosystems BOND.

TA9145 рассчитан на проведение 60 исследований (150 предметных стекол):
60 предметных стекол для исследования с HER2 Primary Antibody
60 предметных стекол для исследования с HER2 Negative Control
15 HER2 контрольных предметных стекол с HER2 Primary Antibody
15 проверок внутрилабораторной позитивной контроль-ткани с HER2 Primary Antibody



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



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

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

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

Содержание

Использование по назначению	3
Обзор и описание	3
Исходная информация.....	3
Выражение HER2	3
Обзор клинической конкордантности.....	3
Принцип процедуры	4
Предоставляемые компоненты	4
Указания по использованию	5
Хранение и стабильность	5
Приготовление образцов.....	5
Предупреждения и предостережения	5
Процедура	6
A. Необходимые, но не предоставляемые реактивы.....	6
B. Необходимое, но не предоставляемое оборудование.....	6
C. Методология	6
D. Предметные стекла.....	6
E. Этапы процедуры.....	7
Контроль качества	9
HER2 Контрольное предметное стекло – HER2 Primary Antibody	10
Внутрилабораторная позитивная контроль-ткань – HER2 Primary Antibody	10
Компонент внутрилабораторной негативной контроль-ткани – HER2 Primary Antibody	10
Ткань пациента – HER2 Negative Control	10
Ткань пациента – HER2 Primary Antibody	10
Проверка анализов	11
Интерпретация окрашивания.....	11
Порядок скрининга предметных стекол	12
1. Контрольное предметное стекло HER2 – HER2 Primary Antibody	12
2. Внутрилабораторная позитивная контроль-ткань – HER2 Primary Antibody	12
3. Внутрилабораторная негативная контроль-ткань – HER2 Positive Control	12
4. Ткань пациента – окрашенная с использованием HER2 Negative Control	12
5. Ткань пациента – окрашенная с использованием HER2 Primary Antibody.....	12
Ограничения	12
A. Общие ограничения	12
B. Ограничения, относящиеся к продуктам	13
Данные колоний клеток	14
Клиническая конкордантность Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest ...	14
Результаты конкордантности 2x2	15
Результаты конкордантности 3x3	15
Клиническая конкордантность Bond Oracle HER2 IHC System к PathVysion HER-2 DNA Probe Kit	16
Результаты конкордантности 3x2	16
Иммунореактивность – нормальная панель	18
Оценка воспроизводимости результатов	19
Внутрисерийная и межсерийная проверка точности	19
A. Внутрисерийная проверка точности	19
B. Межсерийная проверка точности.....	19
C. Воспроизводимость от партии к партии	20
D. Межлабораторная воспроизводимость	20
E. Межнаблюдательная воспроизводимость	21
F. Межинструментальная точность (BOND-MAX и BOND-III)	21
Поиск и устранение неисправностей	23
Справочный материал	24
Изменения и дополнения к предыдущему изданию	25
Дата издания	25
Значение символов	25

Использование по назначению

Для диагностики *in vitro*

Bond Oracle HER2 IHC System представляет собой полуколичественный иммуногистохимический (ИHC) анализ для определения состояния онкогенного белка HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста) в ткани рака груди для гистологической оценки. Bond Oracle HER2 IHC System показан в качестве помощи при оценке состояния пациентов, для которых рассматривается лечение препаратом Herceptin® (trastuzumab) (см. рекламный вкладыш в упаковке Herceptin®).

Примечание: все пациенты, на которых испытывается Herceptin®, были выбраны с использованием исследовательского иммуноцитохимического анализа для клинических исследований (СТА). Ни один из пациентов в рамках этих исследований не был выбран с помощью Bond Oracle HER2 IHC System. Bond Oracle HER2 IHC System был сравнен с Dako HercepTest™ на независимом наборе образцов и выдал приемлемо конкордантные результаты, как показано в Обзоре клинической конкордантности. Фактическая корреляция Bond Oracle HER2 IHC System к клиническому результату не установлена.

Обзор и описание

Исходная информация

Bond Oracle HER2 IHC System содержит мышиное моноклональное антитело anti-HER2, клон CB11. Clone CB11, изначально разработанный компанией Corbett et al (1) и изготавливаемый компанией Novocastra Laboratories Ltd (ныне Leica Biosystems Newcastle Ltd), направлен против внутреннего домена онкогенного белка HER2.

В некоторой части пациентов с раком груди онкогенный белок HER2 чрезмерно выражен в рамках процесса злокачественного преобразования и прогрессирования опухоли (2). Чрезмерная выраженность онкогенного белка HER2, обнаруженная в клетках рака груди, предполагает HER2 в качестве цели для терапии на базе антител. Herceptin® – это «очеловеченное» моноклональное антитело (3), имеющее большое сродство с онкогенным белком HER2 и тормозящее рост человеческих опухолевых клеток, дающих чрезмерную выраженность онкогенного белка HER2 как *in vitro*, так и *in vivo* (4–6).

С момента появления первой иммунопероксидазной технологии (Nakane и Pierce), (7) в области иммуногистохимии появилось множество разработок, что привело к росту чувствительности. Одна из недавних разработок – использование полимерной маркировки. Эта технология применялась и к первичным антителам, и к иммуногистохимическим системам определения (8). Система определения Compact Polymer™, используемая в Bond Oracle HER2 IHC System, относится к семейству новых управляемых технологий полимеризации, специально разработанных для подготовки полимерных HRP-связанных конъюгатов антител. Поскольку эта полимерная технология используется в линейке продуктов Oracle, проблема неспецифического эндогенного окрашивания биотина, характерная для систем определения стрептавидина / биотина, не возникает.

Выражение HER2

Онкогенный белок HER2 выражается на уровнях, обнаруживаемых иммуногистохимией до 20% случаев аденокарциномы различной локализации. 10–20% инвазивных карцином из эпителия протоков груди дают положительную реакцию на онкогенный белок HER2 (9). 90% случаев карциномы из эпителия протоков *in situ* (DCIS) угревого типа положительны (10), вместе почти со всеми случаями педжетоидной болезни груди (11).

Обзор клинической конкордантности

Bond Oracle HER2 IHC System был разработан как альтернатива исследовательскому иммуноцитохимическому анализу для клинических исследований (СТА), используемому в клинических исследованиях Herceptin®. Характеристики Bond Oracle HER2 IHC System в плане определения повышенной выраженности онкогенного белка HER2 были проанализированы в рамках независимого анализа, где сравнивались результаты Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest на 431 образце грудной опухоли, американского происхождения. Ни один из этих образцов не был получен от пациентов в рамках клинических исследований Herceptin®. Результаты показали 92,34% конкордантность в анализе 2x2 (95% доверительных интервалов 89,42–94,67%) и 86,54% в анализе 3x3 (95% доверительных интервалов 82,95–89,62%) между результатами двух анализов.

Принцип процедуры

Bond Oracle HER2 IHC System содержит компоненты, необходимые для выполнения процедуры иммуногистохимического окрашивания для тканей, фиксированных формалином и пропитанных парафином. После инкубации с готовым к использованию HER2 Primary Antibody (клон CB11), в этой системе применяется готовая к использованию технология Compact Polymer. Энзиматическое преобразование добавляемого впоследствии хромогена приводит к образованию видимого продукта реакции при локализации антигенов. В этом случае участки ткани можно контрокрашивать, обезвоживать, делать прозрачными и готовить для исследования. Результаты интерпретируются с помощью световой микроскопии. Для валидации серий окрашивания имеются контрольные предметные стекла с четырьмя фиксированными формалином и пропитанными парафином колониями клеток рака груди. Четыре колонии клеток демонстрируют выраженность онкогенного белка HER2 с интенсивностью 0, 1+, 2+ и 3+. Интенсивность окрашивания этих колоний клеток соотносится и с рецепторной нагрузкой онкогенного белка HER2 на каждую клетку, и состоянием усиления гена HER2.

Bond Oracle HER2 IHC System (код продукта TA9145) предназначен для использования на полностью автоматизированной, улучшенной системе окрашивания Leica Biosystems BOND.

Предоставляемые компоненты

Перечисленные ниже материалы (Таблица 1) достаточны для окрашивания 150 предметных стекол (60 исследуемых предметных стекол, инкубированных с HER2 Primary Antibody, 60 исследуемых предметных стекол, инкубированных с HER2 Negative Control, 15 HER2 контрольных предметных стекол, инкубированных с HER2 Primary Antibody и 15 внутрилабораторных анализов позитивной контроль-ткани, инкубированных с HER2 Primary Antibody). Количество исследований основывается на автоматизированной раздате по 150 мкл на каждое предметное стекло. Материалов в комплекте достаточно для 15 отдельных серий окрашивания BOND.

HER2 Контрольные предметные стекла, (x15)	Области фиксированных формалином и пропитанных парафином колоний клеток рака груди, демонстрирующих выраженность онкогенного белка HER2 с интенсивностями окрашивания 0, 1+, 2+ и 3+ при окрашивании в соответствии с прилагаемым протоколом. Эти области полностью приклеиваются и не требуют дополнительного спекания.
HER2 Primary Antibody, 13,5 мл	Содержит готовое к использованию, аффинажно-очищенное мышиное моноклональное антитело IgG, клон CB11 и 0,035% 2-метилизотиазол-3(2H)-он.
HER2 Negative Control, 9 мл	Содержит готовое к использованию мышиное антитело IgG в эквивалентной концентрации к HER2 Primary Antibody и 0,035% 2-метилизотиазол-3(2H)-он.
Peroxide Block, 22,5 мл	Содержит 3–4% перексид водорода.
Post Primary, 22,5 мл	Кроличье антимышинное IgG (<10 мкг/мл) в Tris-буферизованном соляном растворе с содержанием 10% (v/v) животной сыворотки и 0,01% 2-метилизотиазол-3(2H)-он.
Polymer, 22,5 мл	Poly-HRP козье антикроличье IgG (<25 мкг/мл) в Tris-буферизованном соляном растворе с содержанием 10% (v/v) животной сыворотки и 0,01% 2-метилизотиазол-3(2H)-он.
DAB Part 1, 2,25 мл	Содержит 66 мМ 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорида в стабилизирующем растворе.
DAB Part B (x2), 22,5 мл	Содержит ≤0,1% (v/v) пероксида водорода.
Hematoxylin, 22,5 мл	Содержит <0,1% гематоксилина.

Таблица 1. Компоненты Bond Oracle HER2 IHC System

Указания по использованию

Все предоставленные реактивы предназначены специально для использования с этим анализом, и номера партий специфичны для каждого Bond Oracle HER2 IHC System. Чтобы анализ прошел валидацию, не следует производить никаких замен.

Хранение и стабильность

Хранить при 2–8 °С. Не замораживать. Сразу после использования вернуть в помещение с температурой 2–8 °С. Любое отклонение от этих условий отменяет валидацию анализа. Убедитесь, что срок годности используемого Bond Oracle HER2 IHC System еще не истек. Признаки загрязнения и/или нестабильности Bond Oracle HER2 IHC System: мутность растворов, появление запаха, наличие осадка. Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть проверены пользователем.

Приготовление образцов

Все образцы должны быть подготовлены под сохранение ткани для иммуногистохимического окрашивания. Для всех образцов следует использовать стандартные методы обработки тканей (12).

Рекомендуется подготавливать ткани в фиксажах на основе формалина, стандартно обрабатывать и пропитывать парафином. Например, резекционные образцы следует блокировать на толщину 3–4 мм и фиксировать в течение 18–24 часов в 10%-м нейтрально-буферизованном формалине. Затем ткани следует обезвоживать в серии спиртов и делать прозрачными с помощью ксилена, после чего пропитывать расплавленным парафином при температуре не более 60 °С. Образцы ткани следует делить на секции через 3–5 мм.

Предметные стекла, необходимые для оценки онкогенного белка HER2 и проверки опухоли, должны готовиться одновременно. Для сохранения антигенности секции ткани на предметных стеклах (Leica BOND Plus Slides – код продукта S21.2113 или Apex BOND Slides – код продукта 3800040) должны окрашиваться в течение 4–6 недель после деления на секции при комнатной температуре (18–24 °С). После деления на секции рекомендуется инкубировать предметные стекла в течение 12–18 часов (оставить на ночь) при 37 °С. Секции, требующие дополнительного прилипания, можно инкубировать при 60 °С в течение еще одного часа.

В США Постановление о совершенствовании деятельности клинических лабораторий от 1988 года в 42 CFR 493.1259(b) гласит: «Лаборатория обязана хранить окрашенные предметные стекла в течение не менее десяти лет с даты исследования и хранить блоки образцов в течение не менее двух лет с даты исследования».

Предупреждения и предостережения

Только для профессиональных пользователей.

Один или несколько компонентов в продукте являются опасными.

Как правило, лица моложе 18 лет не допускаются к работе с этим продуктом. Пользователи должны быть тщательно проинструктированы о порядке работы, опасных свойствах продукта и правилах техники безопасности.

Симптомами слишком длительного воздействия ProClin™ 950, используемого в реактивах Oracle консерванта, могут быть раздражение кожи, глаз, слизистой оболочки и верхних дыхательных путей. Максимальная концентрация ProClin™ 950 в этом продукте 0,35%. Эти растворы не отвечают критериям Закона о технике безопасности и гигиене труда (OSHA) в отношении опасных веществ. По запросу предоставляется паспорт безопасности вещества. Его можно также найти на сайте www.LeicaBiosystems.com.

С образцами, до и после фиксации, и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с разносчиками инфекции и утилизировать их с должной предосторожностью.

Никогда не пипетируйте реактивы ртом и избегайте попадания реактивов и образцов на кожу и слизистую оболочку. При попадании реактивов и образцов на чувствительные области обильно промойте их водой. Обратитесь за медицинской помощью. По утилизации любых потенциально токсичных компонентов см. федеральные и региональные правила.

Минимизируйте микробное заражение реактивов, в противном случае может увеличиться неспецифическое окрашивание.

Процедура

A. Необходимые, но не предоставляемые реактивы

- BOND Dewax Solution (код продукта AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (код продукта AR9961)
- BOND Wash Solution, Concentrate x10 (код продукта AR9590)
- Стандартные растворы, используемые в иммуногистохимии (например, этанол, абсолютный и сортовой)
- Ксилен (или его аналоги)
- Среда
- Дистиллированная или деионизированная вода

B. Необходимое, но не предоставляемое оборудование

- Leica Biosystems' BOND-MAX и BOND-III, полностью автоматизированные, улучшенные системы окрашивания
- BOND Universal Covertiles (код продукта S21.2001, S21.4583 или S21.4611)
- BOND Mixing Stations (код продукта S21.1971)
- Сушильная печь, способная поддерживать температуру 60 °C
- Световой микроскоп (увеличение 4–40x)
- Предметные стекла (Leica BOND Plus Slides – код продукта S21.2113 или Apex BOND Slides – код продукта 3800040)
- Покровные стекла
- BOND Slide Label & Print Ribbon (код продукта S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (код продукта CS9100)

C. Методология

- Прежде чем применить данную методологию, пользователи должны быть обучены полностью автоматизированным иммуногистохимическим технологиям BOND.
- Для каждой окрашиваемой с помощью HER2 Primary Antibody секции потребуются идентичная секция для окрашивания с помощью HER2 Negative Control. Секция негативного контроля позволяет дифференцировать специфическое и неспецифическое окрашивание в месте локализации антигена. Каждая серия окрашивания BOND должна включать в себя контрольное предметное стекло HER2. В конце протокола окрашивания, если колонии клеток не показывают правильных рисунков окрашивания (см. Руководство по интерпретации результатов Bond Oracle HER2 IHC System), то серия окрашивания не проходит валидацию.

D. Предметные стекла

С каждым предметным стеклом следует использовать новый BOND Universal Covertile (код продукта S21.2001, S21.4583 или S21.4611). Использование BOND Universal Covertiles ранее использовавшихся для иммуногистохимического или гибридационного окрашивания *in situ*, по результатам этого исследования не прошло валидацию.

Расположение контейнера с предметными стеклами (Таблица 2) обеспечивает оптимальные характеристики Bond Oracle HER2 IHC System и выполнение полных 60 исследований.

Положение предметного стекла	Описание предметного стекла	Реактив	Тип ткани	Значок предметного стекла
1	Пациент 1	*HER2 Negative Control	Исследуемая	
2	Пациент 2	*HER2 Negative Control	Исследуемая	
3	Пациент 3	*HER2 Negative Control	Исследуемая	
4	Пациент 4	*HER2 Negative Control	Исследуемая	
5	Пациент 1	*HER2 Primary Antibody	Исследуемая	
6	Пациент 2	*HER2 Primary Antibody	Исследуемая	
7	Пациент 3	*HER2 Primary Antibody	Исследуемая	
8	Пациент 4	*HER2 Primary Antibody	Исследуемая	
9	HER2 Контрольное предметное стекло	*HER2 Primary Antibody	Позитивный контроль	
10	Внутрилабораторный контроль ткани	*HER2 Primary Antibody	Позитивный контроль	

Таблица 2. Расположение контейнера с предметными стеклами, с указанием типа ткани и реактива

Е. Этапы процедуры

Выполните перечисленные ниже этапы для составления контейнера с предметными стеклами по схеме, описанной в Таблице 2. Эти инструкции следует изучать вместе с Руководством по системе BOND.

1. На инструменте BOND проверьте, достаточно ли вместительны емкости для сыпучих и опасных отходов для выполнения необходимых серий окрашивания.
2. Убедитесь в наличии спирта, дистиллированной или деионизированной воды, BOND Dewax Solution (поставляемого в готовом виде), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (поставляемого в готовом виде) и BOND Wash Solution (поставляемого в виде концентрата x10) в емкостях для сыпучих реактивов для выполнения необходимых серий окрашивания.
3. Убедитесь, что установлена чистая BOND Mixing Station.
4. Включите полностью автоматизированную, улучшенную систему окрашивания BOND.
5. Включите контроллер BOND, подключенный к полностью автоматизированной, улучшенной системе окрашивания BOND.
6. Откройте программное обеспечение BOND.
7. У новой BOND Oracle HER2 BOND IHC System просканируйте штрихкоды лотков с реактивами ручным сканером, чтобы войти в каталог реактивов BOND.
8. Перейдите в окно настроек предметного стекла и щелкните на **Add case (Добавить пациента)**.

9. Введите данные для первого пациента. Убедитесь, что объем раздачи установлен на **150 мкл**, а протокол подготовки – на ***Dewax (Депарафинизация)**. Щелкните на «ОК».
10. Когда пациент выделится в окне настроек предметного стекла, щелкните **Add slide (Добавить предметное стекло)**.
11. Сначала добавьте исследуемые предметные стекла пациента. Убедитесь, что тип ткани установлен на **(Test tissue) Исследуемая ткань**.
12. Убедитесь, что объем раздачи установлен на **150 мкл**, а протокол подготовки – на ***Dewax (Депарафинизация)**.
13. Выберите режимы окрашивания **Single (Одиночный)** и **Oracle** (не **Oracle control (Oracle контроль)**).
14. Выберите процесс **IHC**.
15. Выберите ***HER2 Negative Control** из списка. На вкладке «Протоколы» (Protocols) по умолчанию стоит правильный протокол окрашивания (***IHC Protocol H**) и **NIER (*NIER 25 мин с ER1 (97))**.
16. Щелкните на **Add slide (Добавить предметное стекло)**. Будет создано предметное стекло с реактивом негативной контроль-ткани.
17. Не закрывая окно добавления предметного стекла, выберите ***HER2 Primary Antibody** из списка. Стандартные протоколы и все прочие настройки останутся без изменения.
18. Щелкните на **Add slide (Добавить предметное стекло)**. Будет создано исследуемое предметное стекло.
19. Повторяйте шаги с 8 по 18, пока не будут созданы все пациенты и исследуемые предметные стекла пациентов.
20. Затем создайте контрольное предметное стекло **HER2**. Добавьте его к последнему пациенту или создайте нового пациента для контрольных предметных стекол, в зависимости от того, какова ваша стандартная лабораторная практика.
Важное замечание: Чтобы анализ прошел валидацию, Bond Oracle HER2 IHC System требует включать контрольное предметное стекло **HER2** в каждую серию окрашивания (т. е. в контейнер с предметными стеклами).
21. В окне добавления предметного стекла задайте тип ткани **Positive tissue (Позитивная контроль-ткань)**.
22. Щелкните на **Oracle control (Oracle контроль)**.
23. Выберите номер партии контрольного предметного стекла **HER2** в списке **Lot No (№ партии)**. Номер партии вписывается на маркировочной полоске предметного стекла.
Важное примечание: Контрольное предметное стекло **HER2** должно быть из того же Bond Oracle HER2 IHC System, который будет использоваться.
24. Выберите ***HER2 Primary Antibody** из списка. Сохраните объем раздачи, режим окрашивания, настройки процесса и протокола.
25. Щелкните на **Add slide (Добавить предметное стекло)** для добавления контрольного предметного стекла **HER2**.
26. И, наконец, добавьте контрольное предметное стекло внутрилабораторной позитивной контроль-ткани.
27. Уберите галочку с **Oracle control (Oracle контроль)**.
28. Выберите ***HER2 Primary Antibody** из списка. Сохраните объем раздачи, режим окрашивания, настройки процесса и протокола. Тип ткани останется прежним: **Positive tissue (Позитивная контроль-ткань)**.
29. Щелкните на **Add slide (Добавить предметное стекло)**. На этом создание предметного стекла завершено.
30. Распечатайте наклейки для предметных стекол. На всех наклейках для предметных стекол Oracle напечатано «ОС». На наклейке контрольного предметного стекла **HER2** также значится номер партии Bond Oracle **HER2 IHC System**.
31. Наклейте наклейки на предметные стекла.
32. Откройте крышки всех емкостей Bond Oracle **HER2 IHC System** и загрузите лоток с реактивом в **BOND**.

33. Положите предметные стекла в контейнер в порядке, указанном в разделе D, Таблица 2. Установите новые BOND Universal Covertiles.
34. Загрузите контейнер с предметными стеклами на BOND и нажмите кнопку **Load/Unload (Загрузка/разгрузка)**.
35. Убедитесь, что предметные стекла отсканированы и щелкните на кнопке **Run (Play) (Серия)** в окне состояния системы.
36. Убедитесь, что в поле индикатора контейнера отображается **Proc (OK)**, номер партии и время завершения.
37. По окончании серии нажмите кнопку **Load/Unload (Загрузка/разгрузка)** и выньте контейнеры с предметными стеклами.
38. Снимите BOND Universal Covertiles и промойте предметные стекла в деионизированной воде.
39. Обезвожьте секции, очистите и установите их.

Контроль качества

Различия в фиксировании, обработке и заливке тканей в лаборатории пользователя могут привести к значительным расхождениям результатов, необходимости регулярного проведения внутреннего контроля в дополнение к контрольным предметным стеклам HER2, предоставленным Leica Biosystems в Bond Oracle HER2 IHC System. См. Директивы по контролю качества Коллегии Американских патологов (CAP), Программу сертификации для иммуногистохимии, см. также CLSI (бывшая NCCLS), Контроль качества в иммуноцитохимии, Утвержденные директивы (12) и Специальный отчет: Контроль качества в иммуногистохимии (13). Кроме того, в приведенной ниже Таблице 3 см. типы контроля качества в иммуногистохимии и их предназначение.

Образец*	Описание	HER2 Primary Antibody Окрашивание	HER2 Negative Control Окрашивание
HER2 Контрольное предметное стекло	Как предоставлено в Bond Oracle HER2 IHC System.	Управляет процедурой окрашивания и показывает валидацию характеристик реактивов.	Определение неспецифического фонового окрашивания
Внутрилабораторная позитивная контроль-ткань	Ткань, содержащая заданный антиген. Идеальный контроль – слабо положительная окрашивающая ткань для определения небольших изменений в первичной чувствительности к антигенам.	Контролирует все этапы анализа. Валидирует подготовку ткани и характеристики окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System.	
Компонент внутрилабораторной негативной контроль-ткани	Потенциально негативные контроль-ткани или клетки (могут быть размещены в ткани пациента или в компонентах позитивной/негативной контроль-ткани).	Выявление неспецифической перекрестной реактивности антител с клетками / клеточными компонентами.	

*Фиксация и обработка согласно образцу пациента

Таблица 3. Типы иммуногистохимического контроля качества и их назначение

Контрольная ткань должна представлять собой биопсийные или хирургические образцы, как можно скорее фиксированные формалином, обработанные и пропитанные парафином, и таким же образом, как и образцы пациента. Образцы должны быть соответствующим образом подготовлены под сохранение антигенности ткани для иммуногистохимического окрашивания. Для всех образцов следует использовать стандартные методы обработки тканей (12).

HER2 Контрольное предметное стекло – HER2 Primary Antibody

Каждое из предоставляемых контрольных предметных стекол HER2 содержит четыре колонии клеток рака груди, фиксированных формалином и пропитанных парафином и интенсивностями окрашивания 0, 1+, 2+ и 3+. В каждую серию (т. е. в контейнер с предметными стеклами) должно входить одно предметное стекло. Правильная оценка контрольного предметного стекла HER2, предоставленного Leica Biosystems, показывает валидацию исследования (см. Руководство по интерпретации результатов Bond Oracle HER2 IHC System). Контрольные предметные стекла HER2, предоставляемые вместе с этой системой, служат лишь для валидации характеристик реактива, а не проверяют подготовку ткани.

Внутрилабораторная позитивная контроль-ткань – HER2 Primary Antibody

При использовании компонентов внутрилабораторной позитивной контроль-ткани они должны представлять собой биопсийные или хирургические образцы, как можно скорее фиксированные формалином, обработанные и залитые в парафин, и таким же образом, как и образцы пациента. Контроль позитивной контроль-ткани показывает правильность подготовки тканей и валидирует технологию окрашивания. В каждую серию контроля должно входить как минимум один компонент позитивного контроля. Секция позитивного контроля должна выдавать слабо положительное окрашивание для определения небольших изменений в первичной чувствительности к антителам.

Примечание: Известные компоненты позитивной контроль-ткани должны использоваться только для контроля правильности поведения обрабатываемых тканей вместе с реактивами, НЕ для формулировки конкретной интерпретации образцов пациента. Если позитивная контроль-ткань не демонстрирует должного положительного окрашивания, то результаты, полученные с образцами пациента не получают валидацию.

В качестве подходящего материала для внутрилабораторного контрольного материала можно также эффективно использовать многотканевый блок, содержащий опухоли всех 4 степеней HER2.

Компонент внутрилабораторной негативной контроль-ткани – HER2 Primary Antibody

При использовании компонентов внутрилабораторного негативного контроля они должны представлять собой свежие биопсийные или хирургические образцы, как можно скорее фиксированные формалином, обработанные и залитые в парафин, и таким же образом, как и образцы пациента. Использование контрольной ткани с известным отрицательным результатом по онкогенному белку HER2 в каждой серии окрашивания проверяет специфичность первичного антитела и выявляет неспецифическое фоновое окрашивание. Наличие различных типов клеток в большинстве секций ткани дает области внутреннего негативного контроля (это должно быть проверено пользователем). Опорной точкой для валидации анализа могут служить нормальные протоки груди, не связанные с опухолью. Если специфическое окрашивание происходит в негативной контроль-ткани, то результаты, полученные с образцами пациента не получают валидацию.

В качестве негативных и позитивных контроль-тканей можно использовать многотканевый блок с тканями всех 4 степеней HER2.

Ткань пациента – HER2 Negative Control

Использование прилагаемого HER2 Negative Control вместо HER2 Primary Antibody в соответствующей секции каждого исследования пациента для оценки неспецифического окрашивания и обеспечения точной интерпретации специфического окрашивания онкогенного белка HER2 в локализации антигенов.

Ткань пациента – HER2 Primary Antibody

Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать в контексте неспецифического фонового окрашивания с HER2 Negative Control. Как и при любом иммуногистохимическом анализе, отрицательный результат означает лишь, что антиген не был обнаружен, а не то, что антигена не было в анализируемых клетках или ткани. См.

Порядок скрининга предметных стекол, Ограничения, Оценка поведения и Иммунореактивность для получения подробной информации по иммунореактивности Bond Oracle HER2 IHC System.

Проверка анализов

Перед первым использованием любого антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре пользователь должен проверить специфичность антител путем исследования нескольких своих тканей с известными положительными и отрицательными иммуногистохимическими характеристиками. См. **Контроль качества** выше и требования к контролю качества Сертификационной программы CAP для иммуногистохимии и/или CLSI (бывшая NCCLS), Контроль качества в иммуногистохимии, Утвержденная директива (12). Эти процедуры контроля качества должны повторяться для каждой новой партии антител и при любом изменении параметров анализа. Для проверки анализа подходят человеческая неинвазивная (инфильтрационная) карцинома протоков груди с известными интенсивностями окрашивания онкогенного белка HER2 от 0 до 3+ и другие подходящие негативные контроль-ткани.

Интерпретация окрашивания

Для определения выраженности онкогенного белка HER2 следует оценивать только рисунок и интенсивность окрашивания мембран с помощью шкалы, представленной в Таблице 4. Оценку предметного стекла должен выполнять патолог с помощью светлопольного микроскопа. Для оценки иммуногистохимического окрашивания и шкалирования подойдет объектив с 10x увеличением. Для подтверждения шкалы объектив должен иметь 20–40x увеличение. Цитоплазматическое окрашивание следует рассматривать как неспецифическое и его не следует включать в оценку интенсивности окрашивания мембран (14). По дифференциации интенсивностей окрашивания 0, 1+, 2+ и 3+ см. примеры интенсивностей окрашивания в Руководстве по интерпретации результатов Bond Oracle HER2 IHC System. Шкалировать следует только образцы от пациентов с инвазивной карциномой груди. В случаях с карциномой *in situ* и инвазивной карциномой в одном и том же образце шкалировать следует только инвазивный компонент.

Рисунок иммуногистохимического окрашивания	Результат по шкале	Оценка
Окрашивание не наблюдается либо наблюдается окрашивание мембран менее чем в 10% клеток опухоли.	0	Отрицательный
Наблюдается очень слабое, едва заметное окрашивание мембран более чем в 10% клеток опухоли. Клетки окрашиваются только в части своих мембран.	1+	Отрицательный
Наблюдается окрашивание мембран, от слабого до умеренного, более чем в 10% клеток опухоли.	2+	Неопределенный / слабо положительный
Наблюдается сильное полное окрашивание мембран более чем в 10% клеток опухоли.	3+	Сильно положительный

Таблица 4. Интерпретация окрашивания HER2

Bond Oracle HER2 IHC System для выраженности онкогенного белка HER2 результаты окрашивания интерпретируются как отрицательные при интенсивности окрашивания 0 и 1+, неопределенные / слабо положительные при интенсивности окрашивания 2+, и сильно положительные при интенсивности окрашивания 3+. Bond Oracle HER2 IHC System не предназначен для предоставления прогнозной информации пациенту и/или врачу и не валидирован для этой цели. Для каждой оценки окрашивания предметные стекла нужно исследовать в показанном ниже порядке, чтобы определить валидацию серии окрашивания и обеспечить полуколичественную оценку интенсивности окрашивания образца ткани.

Порядок скрининга предметных стекол

Скрининг предметных стекол должен выполняться в следующем порядке:

1. Контрольное предметное стекло HER2 – HER2 Primary Antibody

Валидированный анализ с контрольным предметным стеклом Oracle HER2 показывает следующее:

- Наличие интенсивного коричневого полного окрашивания мембраны в контрольной колонии клеток SK-BR-3 3+.
- Наличие умеренного коричневого полного окрашивания мембраны в контрольной колонии клеток MDA-MB-453 2+.
- Наличие едва заметного коричневого неполного окрашивания мембраны в контрольной колонии клеток MDA-MB-175 1+.
- Никакого окрашивания в контрольной колонии клеток 0 MDA-MB-231.

Важное замечание: Особенностью контрольной колонии клеток MDA-MB-175 1+ является отчетливый рисунок роста, в котором клетки образуют кластеры. В таком клеточном кластере образуется непрерывная люминальная щеточная пограничная область. Это щеточная пограничная область будет окрашена сильнее, чем вся остальная мембрана клетки. Правильным для онкогенного белка HER2 1+ будет слабое, едва различимое окрашивание клеточной мембраны. В этой колонии клеток может также наблюдаться точечное иммуноокрашивание области Гольджи в цитоплазме.

2. Внутрिलाбораторная позитивная контроль-ткань – HER2 Primary Antibody

НАЛИЧИЕ коричневого окрашивания мембран должно наблюдаться соответственно известному состоянию онкогенного белка HER2 выбранного позитивного контроля.

3. Внутрिलाбораторная негативная контроль-ткань – HER2 Positive Control

Должно наблюдаться ОТСУТСТВИЕ окрашивания мембран. Компонент негативной контроль-ткани подтверждает недостаточность перекрестной реактивности системы обнаружения по отношению к целевым клеткам / клеточным компонентам. Если окрашивание мембраны происходит в компоненте негативной контроль-ткани, то результаты, полученные с образцами пациента не получают валидацию.

4. Ткань пациента – окрашенная с использованием HER2 Negative Control

ОТСУТСТВИЕ окрашивания мембран подтверждает специфическую маркировку целевого антигена первичным антителом. Другое коричневое окрашивание в цитоплазме образца, обработанного HER2 Negative Control, например, в соединительной ткани, лейкоцитах, эритроцитах или омертвевшей ткани, следует считать неспецифическим фоновым окрашиванием и регистрировать.

5. Ткань пациента – окрашенная с использованием HER2 Primary Antibody

HER2 выраженность онкогенного белка определяется критерием, заданным в Таблице 4 и в Руководстве по интерпретации результатов Bond Oracle HER2 IHC System.

Ограничения

А. Общие ограничения

Иммуногистохимия – это лабораторная многоступенчатая технология для интерпретации и определения гистопатологических характеристик. Это технология, требующая специального обучения по всем аспектам процедуры (включая выбор реактивов, ткани, фиксацию, обработку и иммуногистохимическую подготовку предметных стекол) и интерпретации результатов.

Иммуногистохимическое окрашивание ткани зависит от фиксации и обработки

ткани перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывание, сушка, нагрев, секционирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к захвату антител или ложным отрицательным результатам. Причиной искажения результатов могут быть изменения в методах фиксации и заливки тканей или собственные аномалии в ткани (15). Избыточное или неполное окрашивание также может помешать правильно интерпретировать результаты.

Неспецифическое окрашивание, при наличии, обычно имеет размытый вид. В отдельных секциях избыточно фиксированных формалином тканей может также наблюдаться спорадическое окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте неповрежденные клетки. Омертвевшие или дегенерировавшие клетки часто окрашиваются неспецифично (16). Ложноположительные результаты могут наблюдаться из-за неиммунологического связывания белков или продуктов реакции субстрата. Причиной их могут быть также эндогенные ферменты, такие как псевдопероксидаза (эритроциты) или эндогенная пероксидаза (гистогематин С), в зависимости от используемого типа иммуногистохимического окрашивания.

Ткани пациентов, зараженных гепатитом В и содержащие поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), могут давать неспецифическое окрашивание пероксидазой хрена (17). Неожиданное иммуногистохимическое окрашивание и изменения в окрашивании могут быть результатом изменений выраженности кодирующих генов или антигенов. Любое изменение ожидаемых рисунков окрашивания следует интерпретировать в увязке со всеми остальными диагностическими исследованиями.

Интерпретация иммуногистохимического окрашивания должна дополняться морфологическими исследованиями и использованием подходящего контрольного материала, и должна оцениваться квалифицированным патологом в контексте истории болезни пациента и других диагностических исследований.

Анализ (т.е. оценка адекватности как позитивного, так и негативного контроля) и интерпретация любого иммуногистохимического окрашивания или его отсутствия должны выполняться в лаборатории, аккредитованной / лицензированной в установленном порядке, под наблюдением имеющего соответствующую квалификацию и опыт патолога, отвечающего за всю оценку иммуногистохимического анализа и его интерпретацию.

В. Ограничения, относящиеся к продуктам

Данный продукт не предназначен для использования в проточной цитометрии. Для проточной цитометрии не определены характеристики анализа.

Ложные отрицательные результаты могут наблюдаться в результате деградации антигенов в секции ткани. Предметные стекла, необходимые для оценки онкогенного белка HER2 и проверки опухоли, должны готовиться одновременно. Для сохранения антигенности секции ткани на предметных стеклах (Leica BOND Plus Slides – код продукта S21.2113 или Арех BOND Slides – код продукта 3800040) должны окрашиваться в течение 4–6 недель после деления на секции при комнатной температуре (18–24 °С). После деления на секции рекомендуется инкубировать предметные стекла в течение 12–18 часов при 37 °С. Секции, требующие дополнительного прилипания можно инкубировать при 60 °С в течение еще одного часа.

Между колониями клеток, используемых в Bond Oracle HER2 IHC System, можно будет увидеть минимальное естественное изменение иммуногистохимических характеристик. Это естественное изменение находится в допустимых пределах биологической единицы, с большим запасом, и не влияет на интерпретацию результатов и характеристики системы.

Характеристика колоний клеток, использующих и в проточной цитометрии, и в гибридизации *in situ*, как показано в Таблице 5 также подвержены естественному биологическому изменению. Также сообщается техническое и интерпретационное изменение контрольных колоний клеток, оцениваемое флуоресцентной гибридизацией *in situ* (18).

Оценка контрольных предметных стекол HER2 должна учитывать все сроки годности. Хранить Bond Oracle HER2 IHC System при 2–8 °С. Не замораживать. Сразу после использования вернуть в помещение с температурой 2–8 °С. Любое отклонение от этих условий отменяет валидацию анализа.

Не заменяйте реактивы Bond Oracle HER2 IHC System другими компонентами, поставляемыми Leica Biosystems или другими изготовителями. В случае замены валидация анализа отменяется.

Важно, чтобы все описанные в разделах С – Е (Процедура) этапы выполнялись в указанном порядке. Любое отклонение от этого порядка отменяет валидацию анализа.

Важно, чтобы для анализа использовались ткани, фиксируемые только в фиксационных растворах на основе формалина. Использование любых других типов фиксационных растворов отменяет валидацию анализа.

Секции ткани с толщиной среза, выходящей за пределы рекомендуемого диапазона, не прошли валидацию. Использование тканей с недопустимой толщиной среза отменяет валидацию анализа.

Данные колоний клеток

Колония клеток	Характеристика иммуногистохимической системы BOND Oracle HER2	HER2Рецепторная нагрузка на каждую клетку*	HER2 Состояние усиления гена [†]	
			HER2 Номер копии	HER2Соотношение генов :Chr17
SK-BR-3	3+	4,3x10 ⁵	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4x10 ⁵	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3x10 ⁴	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3x10 ³	3,15	1,13

*Рецепторная нагрузка HER2 анализируется путем проточной цитометрии. Состояние усиления гена [†] HER2, оцененное двойной пробой (HER2:Chromosome 17) FISH.

Таблица 5. Характеристика контрольного предметного стекла HER2

Клиническая конкордантность Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest

В первой части исследования изучалась пригодность Bond Oracle HER2 IHC System к использованию при определении лечения препаратом Herceptin® (trastuzumab). Исследование проводилось для изучения конкордантности между Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest, считающимся «золотым стандартом» для этого анализа. Критерием приемлемости была выбрана общая конкордантность между двумя исследованиями с 95% доверительным интервалом, которая должна быть больше либо равна 75%.

Исследование проводилось в двух местах в США. В каждом месте исследований были в наличии образцы ткани рака груди, фиксированные формалином и залитые в парафин с известным состоянием HER2. Пациенты выбирались в обратной последовательности из клинических архивов, представляющих собой последовательный поток случаев в отдел гистопатологии для клинических исследований, и исследовались независимо от их прогностических факторов, без предпочтений в когорте. В лабораториях 1 и 2 были испытаны когорты из 160 и 292 образцов соответственно. В каждой когорте было одинаковое количество неопределенных/положительных (2+, 3+) и отрицательных (0, 1+) случаев, на основании ранее присвоенной иммуногистохимической оценки HER2, давшее суммарную популяцию в количестве 452 образцов. Двенадцать образцов были признаны непригодными из-за недостатка извизивных опухолей и исключены из исследования. Еще девять образцов не удалось шкалировать вследствие подъема ткани с поверхности предметного стекла, в результате чего в итоговой популяции оказался 431 образец.

Ткани всех пациентов были окрашены по HercepTest в соответствии с инструкциями изготовителя, указанными на буклете в упаковке. Последовательные секции ткани каждого пациента окрашивались с помощью Bond Oracle HER2 IHC System, штатной полностью автоматизированной улучшенной системы Leica Biosystems BOND. Все экземпляры были вычленены из уникальных идентификационных данных пациента с приложением клинических данных – размера и стадии опухоли и состояния рецептора эстрогена.

Все окрашенные предметные стекла были замаскированы и шкалированы в случайном порядке опытными наблюдателями в двух лабораториях. Для анализа конкордантности 2x2 результаты были интерпретированы как отрицательные, если интенсивность окрашивания составляла 0 или 1+, и как положительные, если она составляла 2+ или 3+. Для анализа конкордантности 3x3 результаты были интерпретированы как отрицательные, если интенсивность окрашивания составляла 0 или 1+, неопределенные при 2+ и положительные при 3+. Затем был выполнен анализ данных по положительному окрашиванию и отрицательному окрашиванию.

Результаты конкордантности 2x2

В этом первичном анализе результаты двух исследований (Bond Oracle HER2 IHC System и Dako HercepTest) квалифицируются как отрицательные (0,1+) или положительные (2+, 3+). Частоты четырех возможных комбинаций отображаются в виде таблицы 2x2 (см. Таблицу 6). Затем на основе этой таблицы 2x2 была вычислена общая конкордантность с 95% точным доверительным интервалом (на основании биномиального распределения).

Нулевая гипотеза (H_0), которой противопоставлены критерии успешного выполнения – конкордантность не более 75%.

У 431 образца между двумя испытаниями в анализе 2x2 наблюдалась конкордантность 92,34% (398/431) с ДИ 95% из 89,42–94,67%. Эти данные подтверждают отклонение нулевой гипотезы (H_0) о том, что конкордантность не должна быть больше 75% при значении $p < 0.0001$.

Процент положительного согласования (чувствительность) или способность Bond Oracle HER2 IHC System правильно идентифицировать положительные случаи в HercepTest (процент образцов с положительным результатом на основании Bond Oracle HER2 IHC System и HercepTest из всех положительных случаев HercepTest) составил 84,87% (129/152) с ДИ 95% из 78,17–90,16%. Процент отрицательного согласования (специфичность) или способность правильно идентифицировать отрицательные случаи (процент образцов с отрицательным результатом на основании Bond Oracle HER2 IHC System, и HercepTest из всех отрицательных случаев HercepTest) составил 96,42% (269/279) с ДИ 95% из 93,51–98,27%.

		HercepTest		
		Отрицательный	Положительный	Всего
BOND Oracle HER2 IHC System	Отрицательный	269	23	292
	Положительный	10	129	139
	Всего	279	152	431

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

Таблица 6. Конкордантность 2x2 Bond Oracle HER2 IHC System с HercepTest

Результаты конкордантности 3x3

Данные были сгруппированы как отрицательные (0 или 1+), неопределенные (2+) и положительные (3+) для анализа 3x3 и выдали конкордантность 86,54% (373/431) с ДИ 95% из 82,95–89,62%. Соответственно, нулевая гипотеза (H_0) о том, что конкордантность не должна быть больше 75% при значении $p < 0,0001$ была отклонена.

Процент положительного согласования для 3+ (процент образцов с положительным результатом 3+ на основании Bond Oracle HER2 IHC System и HercepTest из всех положительных случаев 3+ с HercepTest) составил 73,33% (66/90) с ДИ 95% из 62,97–82,11%. Процент отрицательного согласования составил 96,42% (269/279) с ДИ 95% из 93,51–98,27%. См. Таблицу 7.

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

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

Таблица 7. Конкордантность Bond Oracle HER2 IHC System с HercepTest

Резюмируя, можно сказать, что полученные в этом исследовании данные показали, что Bond Oracle HER2 IHC System можно использовать для определения лечения препаратом Herceptin® (trastuzumab), на основании его высокой конкордантности с HercepTest.

Клиническая конкордантность Bond Oracle HER2 IHC System к PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Вторая часть исследования была посвящена изучению конкордантности между Bond Oracle HER2 IHC System и Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, считающимся «золотым стандартом» в рефлекторной оценке генов, используемой в сочетании с иммуногистохимией HER2.

Эта часть исследования была проведена в тех же лабораториях с использованием той же когорты, что и в первой части. Ткани всех пациентов были окрашены с помощью Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit в соответствии с прилагаемыми инструкциями изготовителей. Последовательные секции ткани каждого пациента были окрашены с помощью полностью автоматизированной, улучшенной системы окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System BOND (из первой части клинического испытания). Из 431 окрашенных экземпляров в трех случаях не было получено результата из-за недостаточной гибридизации проб. В итоге количество экземпляров в когорте снизилось до 428.

Все окрашенные предметные стекла были шкалированы опытными наблюдателями в двух лабораториях. Для анализа конкордантности 3x2 результаты интерпретировались как отрицательные, если коэффициент генного усиления HER2/CEP17 был меньше 2,0, и как положительные, если он был больше либо равен 2,0 после 20 клеток опухоли.

Результаты конкордантности 3x2

У 428 образцов между двумя испытаниями в анализе 3x2 наблюдалась конкордантность 87,6% (375/428) с ДИ 95% из 84–90%.

Процент положительного согласования (чувствительность) или способность Bond Oracle HER2 IHC System правильно идентифицировать положительные случаи в PathVysion (процент образцов с положительным результатом на основании Bond Oracle HER2 IHC System и PathVysion из всех положительных случаев PathVysion) составил 93,8% (61+30/97) с ДИ 95% из 86,8–97,4%.

Процент отрицательного согласования (специфичность) или способность правильно идентифицировать отрицательные случаи PathVysion (процент образцов с отрицательным результатом на основании Bond Oracle HER2 IHC System, и PathVysion из всех отрицательных случаев PathVysion) составил 85,8% (284/331) с ДИ 95% из 81,6–89,2%. См. Таблицу 8.

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

Общая конкордантность (ДИ 95%) = 87,6% (84 – 90%)

Таблица 8. Конкордантность 3х2 окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System по сравнению с комплектом для взятия проб ДНК PathVysion HER-2.

Иммунореактивность – нормальная панель

Нормальный тип ткани	Рисунок окрашивания	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Надпочечник	Отрицательный	Отрицательный
Мозг, мозжечок	Отрицательный	Отрицательный
Мозг, головной мозг	Отрицательный	Отрицательный
Грудь	Отрицательный	Отрицательный
Костный мозг	Отрицательный	Отрицательный
Толстая кишка	Отрицательный	Отрицательный
Пищевод	Отрицательный	Отрицательный
Глаз	Отрицательный	Отрицательный
Гипофиз	В клетках гипофиза наблюдалось умеренное цитоплазматическое окрашивание (1/3)	Отрицательный
Почка	Отрицательный	Отрицательный
Гортань	Отрицательный	Отрицательный
Печень	Отрицательный	Отрицательный
Легкие	Отрицательный	Отрицательный
Мезотелий	Отрицательный	Отрицательный
Яичник	Отрицательный	Отрицательный
Поджелудочная железа	Отрицательный	Отрицательный
Околощитовидная железа	Отрицательный	Отрицательный
Периферический нерв	Отрицательный	Отрицательный
Простата	Отрицательный	Отрицательный
Слюнная железа	Отрицательный	Отрицательный
Кожа	Отрицательный	Отрицательный
Тонкая кишка	Отрицательный	Отрицательный
Селезенка	Отрицательный	Отрицательный
Желудок	В желудочных железах наблюдалось слабое цитоплазматическое окрашивание (2/3)	Отрицательный
Бороздчатая мышца	Отрицательный	Отрицательный
Яичко	Отрицательный	Отрицательный
Вилочковая железа	Отрицательный	Отрицательный
Щитовидная железа	Отрицательный	Отрицательный
Миндалевидная железа	Отрицательный	Отрицательный
Шейка матки	Отрицательный	Отрицательный
Матка	Отрицательный	Отрицательный

Таблица 9. Нормальное окрашивание панели

Оценка воспроизводимости результатов

Внутрисерийная и межсерийная проверка точности

Проверка точности выполнялась в компании Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Использовалась ткань, фиксированная формалином, пропитанная парафином (TMA), поставщик Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), состоящая из 20 образцов ткани инвазивной карциномы груди диаметром 4 мм. Было отобрано 20 экземпляров на основании ранее присвоенных баллов HER2. По этому принципу было включено x5 случаев HER2 3+, x5 случаев HER2 2+, x5 случаев HER2 1+ и x5 случаев HER2 0.

A. Внутрисерийная проверка точности

Внутрисерийная точность Bond Oracle HER2 IHC System оценивалась в общей сложности на 40 последовательных секциях, взятых из TMA, состоящих из 20 инвазивных опухолей груди и 40 контрольных предметных стекол HER2. Все предметные стекла были окрашены в Bond Oracle HER2 IHC System с помощью полностью автоматизированной, улучшенной системы окрашивания BOND. Секции окрашивались в течение одного непрерывного периода с помощью Bond Oracle HER2 IHC System из той же партии. Окрашенные секции были обесцвечены и оценены в случайном порядке одним опытным наблюдателем для определения внутрисерийной точности.

Анализ предметных стекол из внутрисерийной проверки точности показал, что удалось интерпретировать 733/800 (91,63%) результатов в исследуемых точках. 40 результатов было исключено из-за наличия только DCIS, и еще 27 результатов не удалось интерпретировать из-за потери инвазивной опухоли (специфично для 3 случаев). Изменения в окрашивании произошло в 61 случае (8,32%) из 733 возможных. В 37 случаях наблюдались изменения от 3+ до 2+ ($n = 20$) и от 1+ до 0 ($n = 17$) и поэтому в оценке 2x2 они не представляли собой изменения с клинически положительного до клинически отрицательного и наоборот. Оставшиеся 24 случая (3,27%) представляло собой изменения с клинически отрицательного (0 или 1+) до клинически положительного (2+ или 3+). Проходное значение = 96,7% (ДИ 95% = 95,15–97,81%).

B. Межсерийная проверка точности

Межсерийная точность Bond Oracle HER2 IHC System оценивалась в общей сложности на 24 последовательных секциях, взятых из TMA, состоящих из 20 инвазивных опухолей груди и 24 контрольных предметных стекол HER2. Все предметные стекла были окрашены в Bond Oracle HER2 IHC System с помощью полностью автоматизированной, улучшенной системы окрашивания BOND. Предметные стекла оценивались в 8 независимых сериях, выполненных в одной лаборатории, в рамках трех отдельных случаев с использованием Bond Oracle HER2 IHC System из одной и той же партии. Окрашенные предметные стекла были обесцвечены и оценены в случайном порядке одним опытным наблюдателем для определения межсерийной точности.

Анализ предметных стекол из проверки межсерийной точности показал, что удалось интерпретировать 456/480 (95,00%) результатов в исследуемых точках. 24 результата не удалось интерпретировать из-за потери инвазивной опухоли (специфично для 5 случаев). Изменения в окрашивании произошло в 42 исследуемых точках (9,21%) из 456 возможных. В 30 случаях наблюдались изменения от 3+ до 2+ ($n = 10$) и от 1+ до 0 ($n = 20$) и поэтому в оценке 2x2 они не представляли собой изменения с клинически положительного до клинически отрицательного и наоборот. Оставшиеся 12 случаев (2,63%) представляли собой изменения с клинически отрицательного (0 или 1+) до клинически положительного (2+ или 3+). Проходное значение = 97,37% (ДИ 95% = 95,90–98,77%).

C. Воспроизводимость от партии к партии

Для определения воспроизводимости от партии к партии было изготовлено 3 партии Bond Oracle HER2 IHC System в рамках 3 отдельных случаев и оценено на 24 секциях грудной опухоли (24), взятых из четырех различных блоков ткани, фиксированной формалином и пропитанных парафином (с интенсивностями окрашивания HER2 0, 1+, 2+ и 3+) и контрольных предметных стекол HER2 (12 контрольных точек данных). Было выполнено три независимых серии в одной лаборатории в рамках трех отдельных случаев, в каждом из которых использовалась отдельная производственная партия Bond Oracle HER2 IHC System. Все предметные стекла были окрашены в Bond Oracle HER2 IHC System с помощью полностью автоматизированной, улучшенной системы окрашивания BOND. Окрашенные предметные стекла были замаскированы и оценены в случайном порядке одним опытным наблюдателем для определения воспроизводимости от партии к партии.

Анализ предметных стекол (исследования и контроль) из межсерийной проверки точности показал, что удалось интерпретировать 36/36 результатов в исследуемых точках. В 36 исследуемых точках не произошло никакого изменения окрашивания между тремя разными производственными партиями Bond Oracle HER2 IHC System. Окрашивание с помощью Bond Oracle HER2 IHC System одинаково у всех производственных партий.

D. Межлабораторная воспроизводимость

Межлабораторная воспроизводимость Bond Oracle HER2 IHC System оценивалась в 3 местах – в Leica Biosystems Newcastle Ltd (Site A) и двух независимых лабораториях (B и C) в общей сложности на 192 секциях, взятых из TMA и состоящих из 20 инвазивных опухолей груди и 24 контрольных предметных стекол HER2. Из 192 окрашенных секций TMA 96 были окрашены с помощью HER2 Primary Antibody и 96 – реактивом HER2 Negative Control. Все предметные стекла были окрашены в Bond Oracle HER2 IHC System с помощью полностью автоматизированной, улучшенной системы окрашивания BOND. Предметные стекла оценивались в 8 независимых сериях, выполненных в каждом из трех мест исследования с использованием Bond Oracle HER2 IHC System из одной и той же партии. Окрашенные предметные стекла были обесцвечены и оценены в случайном порядке одним опытным наблюдателем в Leica Biosystems, Newcastle Ltd для определения межлабораторной воспроизводимости.

Анализ предметных стекол из проверки межлабораторной воспроизводимости показал, что удалось интерпретировать 1477/1920 (76,93%) результатов в исследуемых точках. 443 результатов в исследуемых точках не удалось интерпретировать по следующим причинам:

а) Неадекватные характеристики контрольного предметного стекла HER2 в 2/24 случаев, в результате 2 серий / 160 результатов в исследуемых точках были удалены. Это произошло один раз в лаборатории А и один раз в лаборатории В (в каждой лаборатории было удалено по 80 результатов в исследуемых точках).

б) Отклонение от плана исследований в лаборатории С, в котором после окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System было вручную окрашено гематоксилином в общей сложности 24 предметного стекла. Это привело к избыточному контрастированию и контрольных предметных стекол HER2, и исследуемых точек TMA, вследствие чего было удалено 240 исследуемых точек.

с) Потеря инвазивной опухоли с последующим удалением 23 исследуемых точек. Это произошло в 23 случаях в лаборатории А и стало прямым следствием потери ткани в блоке TMA при производстве 192 последовательных секций TMA, необходимых для проведения этого исследования.

д) Не поддающееся интерпретации окрашивание из-за неправильного промывания в полностью автоматизированной улучшенной системе окрашивания BOND вследствие чего было удалено 20 исследуемых точек.

Оценка интерпретируемых предметных стекол в оценке межлабораторной точности показала, что изменение окрашивания произошло в 79 случаях (5,28%) из 1477

возможных. Из них в 14/1477 (0,95%) случаях наблюдались изменения от 0 до 1+ или от 2+ до 3+ и в оценке 2x2 как таковые они не представляли собой изменения с клинически положительного до клинически отрицательного и наоборот. Проходное значение = 99,05% (ДИ 95% = 98,42–99,46%). Из 14 окрашиваний 5/1477 (0,34%) случаев имели место в Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (лаборатория А), 8/1477 (0,54%) – в лаборатории В и 1/1477 (0,07%) – в лаборатории С.

Оставшиеся 65/1477 (4,40%) окрашиваний показали изменение интенсивности с 2+ до 1+ или с 2+ до 0 и поэтому в оценке данных 2x2 представляют собой изменение с клинически положительного до клинически отрицательного и наоборот. Проходное значение = 95,6% (ДИ 95% = 94,42–96,54%). Из 65 клинически значительных изменений 11/65 (16,9%) имели место в Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (лаборатория А), 24/65 (36,9%) – в лаборатории В и 30/65 (46,1%) – в лаборатории С. Из клинически значительных изменений ни в одном случае не произошло изменения с 3+ до отрицательного (0 или 1+) или наоборот.

Е. Межнаблюдательная воспроизводимость

40 случайным образом выбранных случаев инвазивной карциномы груди с одинаковым распределением каждого иммуногистохимического сорта HER2 (резекционных образцов) были последовательно секционированы и предоставлены в Leica Biosystems, Newcastle Ltd (лабораторию А), лабораторию В и лабораторию С для окрашивания и интерпретации. Перед количественной оценкой в каждой лаборатории секции были обесцвечены и разупорядочены. Межнаблюдательная сопоставимость между двумя независимыми лабораториями В и С составила 87,5% (ДИ 95% = 73,3–95,8%). Сопоставимость между лабораториями В и С и Leica Biosystems Newcastle, Ltd составила соответственно 92,5% (ДИ 95% = 79,6–98,4%) и 85% (ДИ 95% = 70,1–94,29%). Анализ совокупной сопоставимости между тремя наблюдателями (А, В, С) выдал 82,50%.

Е. Межинструментальная точность (BOND-MAX и BOND-III)

Межинструментальная проверка точности с помощью Bond Oracle HER2 IHC System была выполнена в одной независимой европейской лаборатории. Исследуемые образцы были получены из фиксированных формалином и пропитанных парафином целых секций из сто тридцать восемь (138) случаев инвазивной карциномы груди (игольчатые и резекционные образцы). Межинструментальная проверка точности выполнялась внутри лаборатории, с окрашиванием последовательных секций на платформах BOND-MAX и BOND-III. Три случая были признаны непригодными из-за удаления образца / опухоли из исследования.

В каждом инструменте использовались идентичные номера партий Bond Oracle HER2 IHC System и вспомогательных реактивов BOND Instrument. Срезы окрашивали задним числом. Предметные стекла интерпретировались в лаборатории одним опытным наблюдателем для определения межинструментальной точности.

Анализ предметных стекол в рамках определения межинструментальной точности показал конкордантность 2x2 между положительным (2+, 3+) и отрицательным (0, 1+) из 94,2% (130/138) с доверительным интервалом 95% из 88,9 – 97,5% и 3x3 конкордантность 3x3 между положительным (3+), неопределенным (2+) и отрицательным (0, 1+) из 87,0% (120/138) с ДИ 95% из 80,2 – 92,1%.

		BOND-MAX		
		Отрицательный (0/1+)	Положительный (2/3+)	Всего
BOND-III	Отрицательный (0/1+)	80	1	81
	Положительный (2/3+)	7	50	57
	Всего	87	51	138

Общая конкордантность (ДИ 95%) = 94,2% (88,9 – 97,5%)

Таблица 10. Конкордантность 2x2 окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System по сравнению с окрашиванием на платформах BOND-MAX и BOND-III.

		BOND-MAX			
		Отрицательный (0/1+)	Неопределенный (2+)	Положительный (3+)	Всего
BOND-III	Отрицательный (0/1+)	80	1	0	81
	Неопределенный (2+)	6	5	1	12
	Положительный (3+)	1	9	35	45
	Всего	87	15	36	138

Общая конкордантность (ДИ 95%) = 87,0% (80,2 – 92,1%)

Таблица 11. Конкордантность 3x3 окрашивания Bond Oracle HER2 IHC System по сравнению с окрашиванием на платформах BOND-MAX и BOND-III.

Резюмируя, можно сказать, что полученные в этом исследовании данные показывают высокий уровень конкордантности между системами Leica Biosystems BOND-MAX и BOND-III при оценке с помощью Bond Oracle HER2 IHC System.

Поиск и устранение неисправностей

Проблема	Вероятная причина	Способ устранения
Нет иммуногистохимического окрашивания	Серия прервана до ее завершения	С помощью ПО BOND проверьте наличие ошибок во время серии окрашивания и действуйте в соответствии с инструкциями в ПО BOND.
	Неправильный выбор протокола	В поле «Протокол окрашивания» (Staining Protocol) в окне «Добавить предметное стекло» (Add slide) в качестве значения по умолчанию нужно выбрать *IHC Protocol H .
	Некорректная депарафинизация предметных стекол	В поле «Подготовка» (Preparation) в окне «Добавить предметное стекло» (Add slide) нужно выбрать режим *Dewax .
	Дозируются не те сыпучие реактивы	Проследите, чтобы для всех сыпучих реактивов BOND имелись соответствующие емкости, поставленные в нужные положения на инструменте.
	Загрязнение BOND Wash Solution азидом натрия	Используйте свежий BOND Wash Solution , приготовленный до соответствующей рабочей крепости.
Слабое специфическое иммуногистохимическое окрашивание	Некорректное извлечение эпитопа	Соответствующие реактивы BOND Epitope Retrieval должны быть соотнесены с нужными емкостями, а программное обеспечение BOND должно быть по умолчанию настроено на нужный протокол извлечение эпитопа – *HIER 25 min with *ER1 (97) .
	Неправильная фиксация или обработка исследуемого образца	Должен использоваться фиксаж на основе формалина, а графики обработки должны быть пригодны для исследуемого образца.
	Bond Oracle HER2 IHC System используется по истечении срока годности	Убедитесь, что срок годности используемого Bond Oracle HER2 IHC System еще не истек.
Чрезмерное специфическое иммуногистохимическое окрашивание	Некорректное извлечение эпитопа	Соответствующие реактивы BOND Epitope Retrieval должны быть соотнесены с нужными емкостями, а программное обеспечение BOND должно быть по умолчанию настроено на нужный протокол извлечение эпитопа – *HIER 25 min with *ER1 (97) .
	Изменение в фиксировании	Должен использоваться фиксаж на основе формалина, а графики обработки должны быть пригодны для исследуемого образца. По возможности повторно исследуйте случай с помощью другого блока. Если это невозможно, оцените области, показывающие наилучшие рисунки фиксации в узвязке с соответствующей окрашенной секцией H&E.

Проблема	Вероятная причина	Способ устранения
Неспецифическое фоновое окрашивание	Дозируются не те сыпучие реактивы	Проследите, чтобы для всех сыпучих реактивов BOND имелись соответствующие емкости, поставленные в нужные положения на инструменте.
	Некорректная депарафинизация предметных стекол	В поле «Preparation» (Подготовка) в окне «Add slide» (Добавить предметное стекло) нужно выбрать режим * Dewax .
	Неспецифическая иммуногистохимическая перекрестная реакция в ткани	См. описание BOND Oracle HER2 BOND IHC System, нормальная перекрестная реактивность ткани (см. Таблица 9).
	Неспецифическая иммуногистохимическая перекрестная реакция с областями некроза ткани	Должен использоваться фиксаж на основе формалина, а графики обработки должны быть пригодны для исследуемого образца. По возможности повторно исследуйте случай с помощью другого блока. Если это невозможно, оцените области, показывающие наилучшие рисунки фиксации, в увязке с соответствующей окрашенной секцией H&E.
	Сушка артефакта после завершения серии окрашивания	Если предметные стекла нужно оставить на ночную серию окрашивания, рекомендуется использовать функцию отложенного запуска. Проследите, чтобы в течение этого времени был в наличии достаточный объем дистиллированной или деионизированной воды для дозирования на предметное стекло, чтобы те не высохли.
	Секции приклеиваются к предметного стеклам из-за крахмальных добавок	Используйте бескрахмальные предметные стекла (Leica BOND Plus Slides – код продукта S21.2113 или Apex BOND Slides – код продукта 3800040).
От предметных стекол пациента / контрольных предметных стекол отрывается ткань	Используется не тот тип предметных стекол или плохой дренаж секции	Используйте предметные стекла нужного типа для секций пациента / контрольных секций (Leica BOND Plus Slides – код продукта S21.2113 или Apex BOND Slides – код продукта 3800040). Необходимо обеспечить достаточный дренаж предметных стекол и инкубировать их в течение 12–18 часов при 37 °C (оставить на ночь). Секции, требующие дополнительного прилипания можно инкубировать при 60 °C в течение еще одного часа.

Таблица 12. Bond Oracle HER2 IHC System Руководство по устранению неисправностей.

При возникновении любых проблем с выходом Bond Oracle HER2 IHC System за рамки руководства по устранению неисправностей (см. Таблицу 12) обращайтесь за помощью в региональный отдел техобслуживания Leica Biosystems или к дистрибьютору.

Справочный материал

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. Nadjj, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
16. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry, 2007* (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
17. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
18. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.

Изменения и дополнения к предыдущему изданию

Предоставляемые компоненты, Значение символов.

Дата издания

16 Июль 2020

Значение символов

	Код партии		Хранение		№ каталога
	Медицинский прибор для диагностики in vitro		Изготовитель		Хрупкое изделие
	eIFU - см. Инструкции по использованию		Содержит достаточно для <n> исследований		Использовать до ГГГ-ММ-ДД
SN	Серийный номер	Rx Only	Только рецепт		

Herceptin™ – торговая марка лицензий компании DakoCytomation, Denmark A/S Herceptin® – торговая марка Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd.