

HER-2 检测试剂盒（免疫组织化学法）说明书

【产品名称】

通用名称：HER-2 检测试剂盒（免疫组织化学法）

英文名称：Bond Oracle HER2 IHC System

【包装规格】

60 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外半定量检测 10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋的乳腺癌和胃癌（包括胃和食管交界处）组织切片中 HER-2 蛋白的状态，用于组织学评价。

试剂盒使用的 HER2 一抗为小鼠单克隆抗体（克隆号 CB11），其免疫源为针对人类 c-erbB-2 癌蛋白细胞内结构域靠近 C 末端的人工合成肽。免疫沉淀的结果显示，CB11 可以与 SKBr3 细胞中的 c-erbB-2 癌蛋白特异性结合。

阳性染色应为在超过 10%的肿瘤细胞的细胞膜上观察到棕色的染色。染色结果的判读请见【检测结果的解释】部分。

任何染色或未染色的临床判读应辅以通过使用适当对照的形态学研究，并由具有资质的病理医生根据患者的临床病史及其它诊断检测进行评价。

作为恶性转化和肿瘤发展过程的组成部分，一部分乳腺癌和胃癌病人出现 HER2 癌蛋白过度表达（2）。HER2 状态与胃癌的治疗也有密切的关系（3）。乳腺癌患者 HER2 过度表达预示着 HER2 可以作为治疗的靶点。

在免疫组织化学可检测的水平上，HER2 蛋白在身体不同部位的腺癌中表达率达 20%。10%-20%的乳腺浸润性导管癌（11）和 20%胃癌（12-14）的 HER2 癌蛋白为阳性。连同几乎所有的乳头佩吉特病病例（15），90%的粉刺型导管原位癌都为阳性（16）。

自 Nakane 和 Pierce（9）首次报导免疫过氧化物酶技术以来，免疫组织化学领域已实现了较大的发展，使得其敏感性增强。最近的一项进展便是多聚标记物技术的使用。该技术已经应用于一抗和免疫组化检测系统（8）。HER2 试剂盒所采用的 Compact Polymer™检测系统，即为这一系列创新性、可控聚合技术中的一部分，特别研发用于制备聚合辣根过氧化物酶标记抗体轭合物。由于在 Oracle 产品系列中使用了该多聚物技术，在链霉亲和素/生物素检测系统中观察到的非特异性内源性生物素染色的问题得到解决。

本试剂盒仅用于体外诊断。

【检测原理】

本试剂盒含有完成福尔马林固定、石蜡包埋组织的免疫组化染色过程所需的成份。使用即用型 HER2 一抗（克隆 CB11）孵育后，采用即用型 Compact Polymer 技术进行显色。对后续添加色原的酶反应，会在抗原部位上形成可见的反应产物。然后对该组织切片进行复染、脱水、透明和固定。并在光学显微镜下观察结果。该系统提供含有 4 种福尔马林固定、石蜡包埋的人类乳腺癌细胞系的对照玻片，以验证染色操作过程。这四种细胞系分别展示了 HER2 蛋白 0、1+、2+和 3+的染色强度。这些细胞系的染色强度，与每个细胞的 HER2 蛋白受体载量及 HER2 基因扩增状态相关。

【主要组成成份】

试剂盒中提供的试剂

下表（表 1）所列的材料，足以对 150 张玻片（60 张用 HER2 一抗孵育的试验玻片、60 张用 HER2 阴性对照试剂孵育的对应试验玻片、15 张用 HER2 一抗孵育的 HER2 对照玻片、15 张用 HER2 一抗孵育的室内阳性组织对照玻片）进行染色操作。试验数量，以每张玻片使用 150 μ L 自动分配量为依据。试剂盒提供的材料足以进行最多 15 次独立的 BOND 染色操作。

表 1. 试剂盒成份

HER2 对照玻片 ($\times 15$)	当依据所提供的试验方案进行染色时，可展示 HER2 癌蛋白染色强度为 0、1+、2+ 和 3+ 的福尔马林固定、石蜡包埋的人类乳腺癌细胞系切片。这些切片完全粘附，无需烤片。
HER2 一抗，13.5mL	含即用型、亲和纯化后的小鼠单克隆 IgG 抗体，克隆 CB11 和 0.35% ProClin950。
HER2 阴性对照，9mL	含有与 HER2 一抗等浓度的即用型小鼠 IgG 和 0.35% ProClin TM 950。
过氧化物封闭剂，22.5mL	含 3-4% 的过氧化氢。
一抗后试剂，22.5mL	含 10% (体积比) 动物血清和 0.09% ProClin TM 950 的兔抗小鼠 IgG ($< 10\mu\text{g}/\text{mL}$) Tris 缓冲液。
多聚物，22.5mL	含 10% (体积比) 动物血清和 0.09% ProClin TM 950 的多聚辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG ($< 25\mu\text{g}/\text{mL}$) Tris 缓冲液。
DAB 试剂 1，2.25mL	含 66 mM 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐的稳定剂溶液。
DAB 试剂 B ($\times 2$)，22.5mL	含 $\leq 0.1\%$ (体积比) 的过氧化氢。
苏木素，22.5mL	含 $< 0.1\%$ 的苏木素。

本试剂盒提供的所有试剂，都针对本试验的用途特别配制，各组件的批号对于每批次 HER2 试剂盒具有特异性，批次之间不可混用。

需要但试剂盒中未提供的试剂

- BOND 脱蜡液（产品代码 AR9222）
- BOND 抗原决定簇修复液 1（产品代码 AR9961）
- BOND 10 倍浓度冲洗液（产品代码 AR9590）
- 用于免疫组化的标准溶剂（如无水酒精和梯度酒精）
- 二甲苯（或二甲苯替代品）
- 封固剂
- 蒸馏水或去离子水

【储存条件及有效期】

2~8 $^{\circ}$ C 下储存，有效期为 12 个月。

生产日期和失效期见标签。

避免冷冻。使用后请立即放回 2-8 $^{\circ}$ C。任何偏离该温度的储存条件都可能导致试验无效。

请确保在指定有效期内使用本试剂盒。

如果出现溶液浑浊、发出臭味及出现沉淀物的现象，表明试剂盒受到了污染。

机载稳定性：试剂盒在 Leica BOND 染色机上可稳定 64 小时。

【适用仪器】

适用于全自动组织染色机（Leica BOND-III, BOND-MAX）

【样本要求】

所有样本必须处理，以保存供免疫组化染色的组织。应当对所有样本采用标准的组织处理方法（17）。

建议在福尔马林固定剂中制备组织，然后进行常规组织处理并用石蜡包埋。例如，再切割的样本应当切至 3mm-4mm 的厚度，然后在 10%的中性福尔马林缓冲液中固定 18-24 小时。随后应当使用梯度酒精脱水并使用二甲苯透明，紧接着在温度不超过 60℃的熔化石蜡中浸蜡。组织样本切片厚度应当为 3µm -5µm。

供 HER2 癌蛋白评估和肿瘤验证的玻片，应当在相同时间制备。为保持抗原性，当在室温（20-25℃）下保存时，应当在切片后的 4-6 周内，对封固在玻片（Leica BOND Plus Slides-产品代码 S21.2113）上的组织切片进行染色。在切片后，建议在 37℃温度下对玻片进行 12-18 小时（过夜）的孵育。需要额外粘附的切片，可在 60℃温度下再多孵育一小时。

建议将已染色的玻片保存至少 10 年，且在检测日以后保留样本蜡块至少 2 年。

【检测方法】

A. 需要的设备

- Leica BOND-MAX/BOND-III 全自动组织染色机
- BOND Universal Covertiles™通用盖玻片（产品代码 S21.2001）
- BOND 混合站（产品代码 S21.1971）
- 可维持 60℃温度的干燥箱
- 光学显微镜（4-40 倍物镜放大率）
- 载玻片（Leica BOND Plus Slides-产品代码 S21.2113）
- 盖玻片
- BOND 标签和色带（产品代码 S21.4564）
- BOND 抽吸探针清洁系统（产品代码 CS9100）





B. 方法

- 在了解该方法前，用户必须接受 BOND 全自动免疫组化技术的培训。
- 用 HER2 一抗进行染色的每张试验切片，将需要一张完全相同的切片，以便用 HER2 阴性对照试剂染色。该阴性对照切片，可对抗原部位的特异性染色和非特异性染色进行区别。每轮 BOND 染色都应包括一张 HER2 对照玻片。在染色操作结束时，若细胞系未能显示正确的染色类型（参阅 HER2 试剂盒解释指南），该轮应视为无效。

C. 玻片布局

每张玻片应该使用一张新的 BOND Universal Covertiles 通用盖玻片（产品代码 S21.2001）。以前试验中用过的通用盖玻片，在本试验中不得重复使用。玻片在玻片架的布局（表 2），可实现 HER2 试剂盒的最佳性能，可完成 60 个测试。

表 2. 玻片在玻片架的布局

玻片位置	玻片描述	试剂	组织类型	玻片图标
1	病例 1	*HER2 阴性对照	被测	
2	病例 2	*HER2 阴性对照	被测	
3	病例 3	*HER2 阴性对照	被测	
4	病例 4	*HER2 阴性对照	被测	

5	病例 1	*HER2 一抗	被测	
6	病例 2	*HER2 一抗	被测	
7	病例 3	*HER2 一抗	被测	
8	病例 4	*HER2 一抗	被测	
9	HER2 对照玻片	*HER2 一抗	阳性	
10	内部组织对照	*HER2 一抗	阳性	

D. 检测步骤

遵循以下步骤，设置如表 2 所述的玻片在玻片架的布局。应同时参阅 BOND 仪器用户手册。

1. 确保 BOND 仪器上的大容量废液桶和有害废料容器有足够的容量完成所需的染色操作。
2. 确保机载试剂容器内有足够的酒精、蒸馏水或去离子水、BOND 脱蜡液（按即用型提供）、BOND 抗原决定簇修复液 1（按即用型提供）和 BOND 冲洗液（按 10 倍浓度提供），以进行所需的染色操作。
3. 确保已放置干净的 BOND 混合站。
4. 打开 BOND 全自动组织染色机。
5. 打开与 BOND 全自动组织染色机连接的计算机。
6. 打开 BOND 软件。
7. 对新的 HER2 试剂盒而言，用手持式扫描仪扫描试剂架上的条形码，在系统内录入试剂。
8. 进入玻片设定页面，然后点击**添加病例**（Add case）。
9. 输入第一例病例的详细信息。确保试剂分配量设定为 150 μ L，且试验方案为***脱蜡**（*Dewax）。点击**确定**（OK）。
10. 当该病例在玻片设定页面出现后，点击**添加玻片**（Add slide）。
11. 首先，添加患者的被测玻片。确保组织类型设定为**被测组织**（Test tissue）。
12. 确认分配量为 150 μ L 且制备试验方案为***脱蜡**（*Dewax）。
13. 选择染色模式值为**单独**（Single）和 **Oracle**（请勿点击 Oracle 对照（Oracle control））。
14. 选择过程 **IHC**。
15. 从标记物列表选择***HER2 阴性对照**（*HER2 Negative Control）。试验方案标签默认为正确的染色试验方案（*IHC 试验方案 H（*IHC Protocol H）和 HIER 试验方案（*HIER 25 min with ER1(97)）。
16. 点击**添加玻片**（Add slide）。创建阴性对照试剂玻片。
17. 仍旧在添加玻片（Add slide）对话框，从标记物列表选择***HER2 一抗**（*HER2 Primary Antibody）。默认试验方案和所有其他设定值均保持不变。
18. 点击**添加玻片**（Add slide）。创建被测玻片。
19. 重复第 8 至 18 步，直至创建完所有病例和患者被测玻片。
20. 接下来，创建 **HER2 对照玻片**。将其添加至最后一个病例或为对照玻片创建一个新的病例，这取决于您的标准实验室规范。
重要提示：HER2 试剂盒要求在每一轮（即玻片架）中包括一张 HER2 对照玻片以便验证试验。
21. 在添加玻片（Add slide）对话框，将组织类型设定为**阳性组织**（Positive tissue）。

22. 点击 **Oracle 对照** (Oracle control)。
23. 在批号 (Lot No) 列表中选择 **HER2 对照玻片** 的批号。该批号标于玻片标签区域。
重要提示: HER2 对照玻片必须来自同一 HER2 试剂盒。
24. 从标记物列表选择 ***HER2 一抗** (*HER2 Primary Antibody)。保持分配量、染色模式、过程和试验方案设定值。
25. 点击 **添加玻片** (Add slide) 添加 HER2 对照玻片。
26. 最后, 添加一张阳性内部组织对照玻片。
27. 取消 **Oracle 对照** (Oracle control) 选定。
28. 从标记物列表选择 ***HER2 一抗** (*HER2 Primary Antibody)。保持分配量、染色模式、过程和试验方案设定值。组织类型仍然为 **阳性组织** (Positive tissue)。
29. 点击 **添加玻片** (Add slide), 至此便完成了玻片创建。
30. 打印玻片标签。所有 Oracle 玻片标签都印有“OC”。HER2 对照玻片的标签也有 HER2 试剂盒批号。
31. 在玻片上正确黏贴标签。
32. 打开 HER2 试剂盒容器的盖子, 将试剂架推入 BOND 仪器。
33. 按表 2 所述的顺序, 将玻片放置在玻片架上。使用新的通用盖玻片。
34. 将玻片架推入仪器, 然后按下 **加载/卸载** (Load/Unload) 按钮。
35. 确认玻片已经扫描, 然后点击系统状态页面的 **运行** (Run (Play)) 按钮。
36. 确保托盘指示字段显示 **进行中 (正常)** (Proc (OK)) 并且显示有批号和完成时间。
37. 当本轮完成时, 按下 **加载/卸载** (Load/Unload) 按钮, 然后将玻片架从仪器中移出。
38. 移开盖玻片, 然后在去离子水中漂洗玻片。
39. 脱水、透明并封片。

质量控制

用户实验室中组织固定、处理和包埋的差异, 会产生截然不同的结果, 因此, 除了使用随试剂盒提供的 HER2 对照玻片以外, 还有必要进行定期的内部质控。

请参阅您当地的免疫组织化学质量控制指南。

此外, 免疫组化质量控制的类型及其目的, 请参阅下表 3。

表 3. 免疫组化质量控制及其目的

样本*	描述	HER2 一抗染色	HER2 阴性对照染色
HER2 对照玻片	随试剂盒提供	对染色过程进行质控, 证实试剂的有效性。	检测非特异性背景染色
室内阳性对照组织	含靶抗原的组织。理想的对照组织应为呈弱阳性染色的组织, 以便确定一抗灵敏度的微弱变化。	对分析的所有过程进行质控。验证组织制备和 HER2 试剂盒染色的性能。	
室内阴性对照组织成份	呈阴性的组织或细胞 (可位于患者组织或阳性/阴性对照组织成份中)。	用细胞/细胞成份检测非特异性抗体交叉反应。	

*按患者样本固定和处理

对照组织应当是活检或手术样本, 尽快按处理患者样本的相同方式用福尔马林固定、处理和进行石蜡包埋。样本必须适当处理, 以保持对免疫组化染色的组织抗原性。应当对所有样本采用标准的组织处理方法 (17)。

HER2 对照玻片—HER2 一抗

提供的每张 HER2 对照玻片，都含有四种染色强度评分分别为 0、1+、2+和 3+的福尔马林固定、石蜡包埋人乳腺癌细胞系。每轮试验（即玻片架）必须包含一张对照玻片。对试剂盒中提供的 HER2 对照玻片的正确评估，可表明试验的有效性。HER2 对照玻片仅可提供试剂性能的验证，不能验证组织制备的情况。

内部阳性对照组织—HER2 一抗

若使用内部阳性对照组织，该组织应当是按患者样本相同方式尽快固定、处理和包埋的活检或手术样本。阳性组织对照表明组织制备正确且染色技术有效。每批次样本至少应包括一张阳性对照切片。该阳性对照切片应显示弱阳性染色，以便确定一抗灵敏度的微弱变化。

*注意：*已知的阳性对照组织，仅供与试验试剂一同使用来证明处理组织的正确性，并不能对解释患者样本的结果提供帮助。若阳性对照组织未能显示适当的阳性染色，用患者样本得到的结果便认为是无效的。

也可将含有代表所有 4 个 HER2 等级肿瘤的多组织对照蜡块，作为适当的内部对照材料。

内部阴性对照组织成份—HER2 一抗

若使用内部阴性对照成份，该成份就应当是按患者样本相同方式尽快固定、处理和包埋的新鲜活检或手术样本。在每批次染色操作中，使用已知对 HER2 蛋白呈阴性的对照组织，可验证一抗的特异性，并表明任何非特异性背景染色。大多数组织切片中存在的各种不同细胞类型，提供了内部阴性对照位置（应由用户验证）。与肿瘤无关的正常乳腺导管，可为试验的有效性提供参考。若在内部阴性对照组织中出现特异性染色，则认为用患者样本得到的结果无效。

使用表达所有 4 个 HER2 等级的多组织对照可做为阴性和阳性对照。

患者组织—HER2 阴性对照

针对每例患者试验，使用试剂盒中提供的 HER2 阴性对照代替 HER2 一抗对组织切片进行孵育，以评估非特异性染色并实现对抗原部位的特异性 HER2 蛋白染色的准确判读。

患者组织—HER2 一抗

应当在用 HER2 阴性对照未出现任何非特异性背景染色的情况下评估阳性染色强度。对于任何免疫组化试验而言，阴性结果意味着未检测出抗原，而并非意味着在试验的细胞/组织中没有抗原。有关 HER2 试剂盒免疫反应性的特定信息，请参阅玻片筛选顺序基本原理、局限性、性能评估和免疫反应性。

试验验证

在诊断过程中首次使用任何抗体或染色系统前，用户应当使用一系列已知免疫组化阳性和阴性特性的内部组织进行试验，以此来验证抗体的特异性。

参阅如前所述的质量控制，这样的质量控制程序，应当在使用每批新的抗体时进行，或在试验参数发生变更时进行。已知 HER2 蛋白染色强度从 0 到 3+的浸润性乳腺导管癌（或胃癌）和其他适宜的阴性组织，可用于试验验证。

【检测结果的解释】

染色判读—乳腺

为确定 HER2 癌蛋白表达水平，仅膜染色类型和强度采用表 4 中的等级进行评估。应由病理医生在亮视野显微镜下进行阅片。评估免疫组化染色和评级，使用 10 倍放大率的物镜即可。使用 20-40 倍放大率的物镜是用于确认评分。细胞质染色属非特异性染色，不应包括在膜染色强度评估之内（19）。为帮助区分 0、1+、2+和 3+染色，请参阅 HER2 试剂盒判读指南中染色强度的典型图示。仅对患有浸润性乳腺癌的患者样本进行评分。若在相同样本中既有原位癌又有浸润性癌，仅对浸润性癌进行评分。

表 4. 乳腺癌 HER2 染色判读

免疫组化染色类型	评分	评估
未观察到染色或在低于 10%的肿瘤细胞中观察到膜染色。	0	阴性
在超过 10%的肿瘤细胞中检测到微弱/几乎察觉不到的膜染色。仅对一部分细胞膜染色。	1+	阴性
在超过 10%的肿瘤细胞中观察到轻微到中度的完全膜染色。	2+	疑似（弱阳性）
在超过 10%的肿瘤细胞中观察到明显的完全膜染色。	3+	强阳性

在 HER2 试剂盒染色结果中，0 和 1+的染色强度判定为 HER2 蛋白表达阴性，2+的染色强度判定为疑似（弱阳性），而 3+的染色强度判定为强阳性。HER2 试剂盒并未欲意为患者和/或医师提供预后信息，且针对该用途未进行验证。对每一次染色评估而言，应按以下顺序检查玻片，以确定染色操作的有效性，实现样本组织染色强度的半定量评估。

染色判读—胃

为确定 HER2 癌蛋白表达水平，仅膜染色类型和强度采用下表 5.中的等级进行评估。应由使用亮视野显微镜的病理医生进行阅片。评估免疫组化染色和评级，10 倍放大率的物镜即可。使用 20-40 倍放大率的物镜是用于确认评分。细胞质染色属非特异性染色，不应包括在膜染色强度评估之内（15）。为帮助区分 0、1+、2+和 3+染色，请参阅 HER2 试剂盒判读指南中染色强度的典型图像。仅对患有胃癌和胃食管连接处癌症的患者样本进行评分。

表 5. 胃癌 HER2 染色判读

样本类型	免疫组化染色类型	评分	评估
外科手术样本	未观察到染色或在低于 10%的肿瘤细胞中观察到膜染色。	0	阴性
	在超过 10%的肿瘤细胞中检测到微弱/几乎察觉不到的膜染色。仅对一部分细胞膜染色。	1+	阴性
	在超过 10%的肿瘤细胞中观察到轻微到中度的完全膜或基底膜染色。	2+	疑似（弱阳性）
	在超过 10%的肿瘤细胞中观察到明显的完全膜染色或基底膜染色。	3+	强阳性
活检样本	肿瘤细胞中未观察到任何染色	0	阴性
	肿瘤细胞簇观察到微弱/几乎察觉不到的基地外侧膜染色。不必考虑染色细胞的百分比	1+	阴性
	肿瘤细胞簇观察到轻微到中度的完全膜染色。	2+	疑似（弱阳性）
	在超过 10%的肿瘤细胞中观察到明显的完全膜染色。	3+	强阳性

HER2 试剂盒染色结果解释活检样本结果时，建议至少观察五个肿瘤细胞簇。

阅片顺序

应当按以下顺序阅读玻片：

1. HER2 对照玻片——HER2 一抗

用 Oracle HER2 对照玻片进行的有效试验如下所示：

- 在 3+对照细胞系 SK-BR-3 上出现深褐色的完全细胞膜染色。
- 在 2+对照细胞系 MDA-MB-453 上出现轻微到中度褐色的完全细胞膜染色。
- 在 1+对照细胞系 MDA-MB-175 上出现微弱/几乎察觉不到的不完全细胞膜染色。
- 在 0 对照细胞系 MDA-MB-231 上未出现染色。

重要提示：MDA-MB-175 1+对照细胞系的一个特性是，细胞形成细胞簇的明显生长模式。该细胞簇会导致横跨细胞簇的连续细胞腔刷状缘区域。刷状缘染色比细胞膜剩余部分的明显。它是微弱/几乎察觉不到的不完全细胞膜染色，是正确的 HER2 蛋白 1+染色模式。还可能在细胞系内观察到细胞质内高尔基体区域的点状免疫染色。

2. 内部阳性对照组织——HER2 一抗

应当观察到与所选阳性对照已知 HER2 蛋白状态相对应的褐色细胞膜染色。

3. 内部阴性对照组织成份——HER2 阴性对照

应当观察到没有出现细胞膜染色。阴性对照组织成份可确认，没有特异性靶细胞/细胞成份与检测系统交叉反应。若阴性对照组织成份发生细胞膜染色，用患者样本得到的结果视为无效。

4. 患者组织——用 HER2 阴性对照染色

没有出现细胞膜染色，证明通过一抗对靶抗原进行标记的特异性。用 HER2 阴性对照处理的样本细胞质中发生的其他褐色染色，如在结缔组织、白细胞、红细胞或坏死组织中的染色，都应视为非特异性背景染色且应当加以注意。

5. 患者组织——用 HER2 一抗染色

HER2 癌蛋白表达水平，是由表 4 和 HER2 试剂盒解释指南中规定的标准加以确定的。

染色图片示例见附录

【检测方法的局限性】

A. 普遍局限性

免疫组化是一项以实验室为基础的多步骤技术，用以协助解释和确定组织病理特性。这是一门要求在程序（包括选择适当的试剂、组织、固定、处理和 IHC 玻片制备）和判读各个方面进行专门培训的技术。

组织染色取决于组织染色前处理和操作情况。不恰当的固定、冰冻、溶解，冲洗、干燥、加热、切片或者其他组织或者液体的污染都可能产生人为误差、抗体捕获或者假阴性结果。前后矛盾的结果可能与固定和包埋方法有关，或者是组织内部本身的不一致性导致（21）。过度的或者不充分的复染可能会影响正确的结果判读。

如果存在非特异性染色，通常会出现一种浸润性的现象。也可能在用福尔马林过度固定的组织切片中，观察到结缔组织的零星染色。需使用完好无损的细胞进行染色结果判读。坏死或退化细胞常常会发生非特异性染色（22）。还会因为蛋白质或底物反应产物的非免疫性结合，观察到假阳性结果。也会因诸如假过氧化物酶（红血球）或内源性过氧化物酶（细胞色素 C）之类的内源性酶导致上述情况，这取决于所使用的免疫组化染色类型。

感染乙型肝炎病毒患者的组织以及携带乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）患者的组织，可在辣根过氧化酶作用下显示非特异性染色（23）。

未曾预料的免疫组化染色或染色变异，可能是编码基因或抗原表达水平发生改变的结果。预期染色模式的任何改变，都应结合所有其他诊断调查进行判读。

应当通过形态学研究和使用适当的对照材料，对免疫组化染色的解释加以补充，并且应当接合患者的临床病史和具有资质的病理医生进行的其他诊断试验，对解释进行评估。

必须在适当认证/具有执照的实验室内、在具有资质且经验丰富的病理医生监督下，进行试验（即评估阳性和阴性对照的充分性）及对免疫组化染色与否进行解释，上述病理医生对免疫组化试验及其解释的总体评估负有责任。

B. 产品特定局限性

本产品并非设计用于流式细胞仪。还未就流式细胞仪确定其性能特点。

假阴性结果可视为组织切片中抗原衰变的结果。供 HER2 蛋白评估和肿瘤检测的玻璃片，应当在相同时间制备。为保持抗原性，当在室温（20°C-25°C）下保存时，应当在切片后的 4-6 周内，对粘附在玻片中的组织切片进行染色。切片后，建议在 37°C 温度下对玻片进行 12-18 小时的孵育。需要额外粘附的切片，可在 60°C 温度下再多孵育一小时。

在 HER2 试剂盒中采用的细胞系生长批次之间，可观察到免疫组化特性的最小自然变异。该自然变异在生物实体的可接受水平内，且不会影响系统解释或性能。

表 6 所示的用于流式细胞仪和原位杂交的细胞系特性同样受自然生物变异影响。还报告了通过荧光原位杂交评估的对照细胞系的技术和解释参数（24）。

HER2 对照玻片的评估，应考虑所有相关有效期。请参阅【储存条件及有效期】部分。

不可用 Leica 或其他制造商提供的任何其他成份替代 HER2 试剂盒试剂。这样做会使试验失效。

应当按照规定的顺序进行所有的试验步骤。与该顺序的任何偏差可致试验失效。

仅可使用福尔马林固定剂来固定组织。使用任何其他类型固定剂可致试验无效。

组织切片的厚度应在建议的厚度范围内，使用任何其他切片厚度可致试验无效。

细胞系数据

表6. HER2对照玻片特性

细胞系	HER2 试剂盒特性	每个细胞中 HER2 受体载量*	HER2 基因扩增状态*	
			HER2 拷贝数	HER2: 17 号染色体基因比值
SK-BR-3	3+	4.3×10 ⁵	13.35	3.55
MDA-MB-453	2+	1.4×10 ⁵	5.73	2.05
MDA-MB-175	1+	6.3×10 ⁵	3.33	1.20
MDA-MB-231	0	9.3×10 ⁵	3.15	1.13

*HER2 受体数量分析由流式细胞仪评估。*HER2 基因扩增状态由双探针（HER2: 17 号染色体）FISH 评估。

【产品性能指标】

1. 免疫反应性—正常组织

表 7. 正常组织染色

正常组织类型	染色类型	
	HER2 一抗	HER2 阴性对照
肾上腺	阴性	阴性

脑, 小脑	阴性	阴性
脑, 大脑	阴性	阴性
胸部	阴性	阴性
骨髓	阴性	阴性
结肠	阴性	阴性
食道	阴性	阴性
眼	阴性	阴性
脑下垂体	垂体细胞中观察到中度细胞质染色 (1/3)	阴性
肾脏	阴性	阴性
喉	阴性	阴性
肝	阴性	阴性
肺	阴性	阴性
间皮	阴性	阴性
卵巢	阴性	阴性
胰脏	阴性	阴性
甲状旁腺	阴性	阴性
末梢神经	阴性	阴性
前列腺	阴性	阴性
唾液腺	阴性	阴性
皮肤	阴性	阴性
小肠	阴性	阴性
脾	阴性	阴性
胃	胃腺中观察到弱细胞质染色 (2/3)	阴性
横纹肌	阴性	阴性
睾丸	阴性	阴性
胸腺	阴性	阴性
甲状腺	阴性	阴性
扁桃体	阴性	阴性
子宫颈	阴性	阴性
子宫	阴性	阴性

2. 本试剂盒 (Bond Oracle HER2 IHC Systems) 与 Dako HercepTest 的临床一致性 (乳腺)

本研究的目的是为了检验本试剂盒与 Dako HercepTest 之间的符合率。可接受标准为在置信区间 (CI) 95% 的范围内两组试验之间总体符合率大于 75%。

本研究为在美国两处地点进行的盲评估试验。每个调查地点都配有福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺癌样本, HER2 状态已知。从临床档案中逆序选出病例, 反映在组织病理学部门进行医疗试验的病例顺序, 分别试验其他预后的和/或预测的因素, 对实验组无偏差导向性。地点 1 和地点 2 分别试验了 160 个样本和 292 个样本的实验组。每个实验组具有同样比例的疑似/阳性 (2+, 3+) 和阴性 (0, +1) 的病例, 基于之前制定的 HER2 IHC 评分, 总研究数量为 452 个样本。其中十二个样本由于浸润性肿瘤不足而被认为不合适, 并从研究中移除。另有九个样本由于组织脱片而无法评分, 最终研究的数量为 431 个样本。

所有的病例都使用 Dako HercepTest 按照其说明书中的方法染色。随后每个病例的切片都使用本试剂盒通过 BOND 全自动组织染色机进行染色。所有病例都与病人独特的识别信息分离, 并随附与

肿瘤大小、肿瘤阶段、肿瘤等级和雌激素受体蛋白状态相关的临床数据。

所有染色的玻片标记都被遮住，并由经过培训的观察人员随机评分。对于 2×2 的符合率分析，如果染色强度评分为 0 或 1+为阴性，评分为 2+或 3+为阳性。然后对于阳性染色和阴性染色进行数据分析。对于 3×3 符合率分析，如果染色为 0 或 1+，评分为阴性，2+评分为疑似，3+则评分为阳性。然后对阳性染色符合率和阴性染色符合率进行数据分析。

2×2 一致性结果

在此初次分析中，两组试验（Bond Oracle HER2 IHC Systems 和 Dako HercepTest）的试验结果按照阴性（0, 1+）或阳性（2+, 3+）进行归类。四个可能的组合的频率显示在 2×2 表格中（见表 6）。之后根据此 2×2 表格在 95%置信区间上（基于二项分布）计算总体符合率。

与设定的成功标准相对的零假设（ H_0 ）为符合率不大于 75%。

在 2×2 分析中，两组试验之间 431 个样本的总体符合率为 92.34%（398/431），95%CI: 89.42% ~ 94.67%。该数据支持拒绝零假设（ H_0 ），即符合率不大于 75%， p 值 < 0.0001。

阳性符合率（灵敏度）为 84.87%（129/152），95%CI: 78.17% ~ 90.16%。阴性符合率（特异性）为 96.42%（269/279），95%CI: 93.51% ~ 98.27%。

表 8. 本试剂盒与 Dako Hercep Test 的 2×2 一致性（乳腺）

		Dako HercepTest		
		阴性	阳性	合计
本试剂盒	阴性	269	23	292
	阳性	10	129	139
	合计	279	152	431
2×2 一致性（95%CI）=92.34%（89.42% ~ 94.67%）； $p < 0.0001$				

3×3 一致性结果

3×3 的分析数据分为阴性（0 或 1+）、疑似（2+）或阳性（3+），显示的总体符合率为 86.54%（373/431），95%CI: 82.95% ~ 89.62%。因此，零假设（ H_0 ）所说的不大于 75%不符合 p 值 < 0.0001。本研究中 3+的阳性符合率为 73.33%（66/90），95%CI: 62.97% ~ 82.11%。阴性符合率为 96.42%（269/279），95%CI: 93.51% ~ 98.27%。见表 9。

表 9. 本试剂盒与 Dako Hercep Test 的 3×3 一致性（乳腺）

		Dako HercepTest			
		阴性（0 或 1+）	2+	3+	总计
本试剂盒	阴性（0 或 1+）	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	总计	279	62	90	431
3×3 一致性（95%CI）=86.54%（82.95% ~ 89.62%）； $p < 0.0001$					

结论，本研究得到的数据证明，本试剂盒与 HercepTest 的检测结果高度一致。

本试剂盒与 Abbott Molecular PathVysion HER2 DNA 探针的临床一致性（乳腺）

本研究第 2 部分用于评估本试剂盒与 HER2 免疫组化方法相结合使用的基因评估方法“金标准”Abbott Molecular PathVysion HER2 DNA 探针之间的一致性。

本研究在同样的调查地点进行，使用与第 1 部分相同的研究实验组。所有病例都使用 Abbott Molecular PathVysion HER2 DNA Probe Kit 按照其说明书中的方法进行染色。随后每个病例的切片都使用本试剂盒，通过 BOND 组织染色机（来自临床研究的第 1 部分）进行染色。431 个染色病例中

有三次（3）由于探针杂交不足未获得结果，最终实验组共 428 个病例。

所有的染色玻片都由两处调查地点受过培训的观察人员打分。计数 20 个肿瘤细胞后，如果 HER2/CEP17 基因扩增比例小于 (<) 2.0，则 2×2 的符合率分析打分为阴性，如果大于或等于 (>) 2.0，则打分为阳性。

2×2 一致性结果

在 2×2 分析中，两组试验中 428 个样本的总体符合率为 87.6% (375/428)，95%CI: 84% ~ 90%。

阳性符合率（灵敏度）为 93.8% (61+30/97)，95%CI: 86.8% ~ 97.4%。

阴性符合率（特异性）为 85.8% (284/331)，95%CI: 81.6% 到 89.2%。见表 10。

表 10. 本试剂盒与 Abbott Molecular PathVysion HER2 DNA 探针的 2×2 一致性（乳腺）

		PathVysion HER2 DNA 探针		
		阴性	阳性	合计
本试剂盒	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	合计	331	97	428
总体符合率 (95%CI) =87.6% (84%到 90%)				

3. 本试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司 PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的临床一致性（胃）

第 3 部分的试验采用了福尔马林固定、石蜡包埋的分级较高阶段的胃癌样本，以便确定在 BOND 全自动染色机上进行 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司生产的 Pathway 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的一致性。第三部分的可接受标准为两个试剂盒间的总体一致性大于 75%。

对于 2×2 分析，当染色强度为 0 或 1+时判定为阴性染色，当染色强度为 2+和 3+时，判定为阳性染色。对于 3×3 分析，当染色强度为 0 或 1+时判定为阴性染色，2+判定为疑似，3+判定为阳性。数据也进行了阳性一致率和阴性一致率的分析。

结果—Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司的 PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的临床一致性（胃）

在 287 例样本上进行了 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司的 PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的临床一致性试验。

观察到两种试剂盒间的 2×2 一致性为 95.12% (273/287)，95%置信区间为 91.95%-97.31%。该数据支持与设定的成功标准相对的零假设 (H0) 为一致性不大于 75%，且 p 值<0.0001 的假设。阳性一致率的百分比(灵敏度)或 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒可以准确识别 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 检测结果为阳性的百分率 (Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 都测定为阳性的) 为 90.79% (138/152)，95%置信区间为 85.03%-94.87%。阴性一致率的百分比(特异性)或 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒可以准确识别 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 检测结果为阴性的百分率 (Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 都测定为阴性的) 为 100% (135/135)，95%置信区间为 97.30%-100% (见表 11)。

表 11. 胃癌样本染色 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司的 PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的一致性

		Ventana PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5)		
		阴性	阳性	合计
Bond Oracle HER2 IHC 试剂 盒	阴性	135	14	149
	阳性	0	138	138
	合计	135	152	287
总体一致性 (95%置信区间) =95.12% (91.95%到 97.31%)				

3×3 一致性结果

观察到两种试剂盒间的 3×3 一致性为 89.90% (258/287)，95%置信区间为 85.51%-93.13%。该数据支持与设定的成功标准相对的零假设 (H0) 为一致性不大于 75%，且 p 值<0.0001 的假设。3+ 阳性一致率的百分比 (灵敏度) 或 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒可以准确识别 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 检测结果为 3+阳性的百分率 (Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 都测定为 3+阳性的) 为 85.94% (110/128)，95%置信区间为 78.69%-91.45%。阴性一致率的百分比 (特异性) 或 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒可以准确识别 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 检测结果为阴性的百分率 (Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana PATHWAY 抗-HER2/neu (4B5) 都测定为阴性的) 为 100% (135/135)，95%置信区间为 97.30%-100% (见表 12)。

表 12. 胃癌样本染色 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒与 Ventana Medical Systems 公司的 PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5) 兔单克隆抗体的 3×3 一致性

		Ventana PATHWAY 抗 HER2/neu (4B5)			
		阴性 (0 或 1+)	2+	3+	总计
Bond Oracle HER2 IHC 试 剂盒	阴性 (0 或 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	总计	135	24	128	287
总体一致性 (95%置信区间) =89.90% (85.81%到 93.13%)					

4. 重复性:

批内和批间精密度测试

精密度测试在 Leica Biosystems Newcastle Ltd 进行。所用组织为 Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea)所提供的福尔马林固定、石蜡包埋的复合组织芯片 (TMA)，包括 20 个直径为 4mm 的浸润性乳腺癌的组织心。根据之前的 HER2 评分，选出 20 个病例。其中包括 5 个 HER2 3+病例、5 个 HER2 2+病例，5 个 HER2 1+病例和 5 个 HER2 0 病例。

A. 批内精密度测试

本试剂盒的批内精密度测试是在来自组织芯片的共 40 个连续切片 (包括 20 个浸润性乳腺肿瘤) 和 40 个 HER2 对照玻片上评估的。所有的玻片都使用本试剂盒通过 BOND 全自动组织染色机进行染色。切片都在一个连续时间段内使用来自同一批次的试剂盒进行染色。将染色切片标记遮住，由一位有经验的观察人员以随机的方式评估精密度。

批内检查中对玻片的评定显示可评估数据为 733/800(91.63%)。其中 40 个数据因为只出现 DCIS 而排除, 另外 27 个数据由于丢失浸润性肿瘤(具体到 3 个组织块)而不能评分。在 733 个数据中, 有 61 个数据(8.32%)的评分不一致。在其中 37 个数据中, 观察到 20 个数据的染色评分为 3+至 2+, 17 个数据的染色评分为 1+至 0。因此在 2×2 的数据评定中不代表从临床阳性转变为临床阴性, 反之亦然。剩余 24 次(3.27%)代表从临床阴性(0 或 1+)转变为临床阳性(2+或 3+)。通过值=96.7% (95%CI: 95.15% ~ 97.81%)。

B. 批间精密度测试

本试剂盒的批间精密度测试是在来自组织芯片(包括 20 个浸润性乳腺肿瘤)的共 24 个连续切片和 24 个 HER2 对照玻片上进行评定的。玻片在 8 个独立的染色事件上进行评定, 在同一实验室内进行, 在三个不同时间使用来自同一批次的试剂盒。

玻片批间检查评定显示可评估数据为 456/480(95.00%)。由于丢失浸润性肿瘤(具体到 5 个组织块), 24 个数据评分不能评定。在 456 个数据评分中, 有 42 个(9.21%)染色评分不一致。30 个数据观察到 3+至 2+ (n=10) 以及 1+至 0 (n=20), 因此不代表 2×2 的数据评定中从临床阳性转变为临床阴性, 反之亦然。剩余 12 次(2.63%)代表从临床阴性(0 或 1+)转变为临床阳性(2+或 3+)。通过值=97.37% (95%CI: 95.90% ~ 98.77%)。

C. 批间重复性

为了测定批次间的重复性, 在 GMP 条件生产下 3 个不同时间制造的 3 批试剂盒, 并在取自四个不同的福尔马林固定、石蜡包埋的蜡块的 24 个乳腺肿瘤切片(24 试验数据评分)和三个 HER2 对照玻片(12 个控制数据点)的基础上进行评定。在同一实验室三次不同时间进行三个独立批次, 每次使用不同制造批次的试剂盒。

批次间检查的玻片评定显示可评估数据为 36/36。在三组不同制造批次的 HER2 试剂盒的 36 数据评分中没有发生染色变化。使用 HER2 试剂盒染色在所有批次中都是一致的。

D. 实验室间重复性

HER2 试剂盒的实验室间重复性检查在 3 个地点进行评定, 即 Leica Biosystems Newcastle Ltd(地点 A), 和其他两个独立的实验室(地点 B 和 C), 切片总数为 192 个, 取自包含 20 个浸润性乳腺肿瘤的组织芯片 TMA 和 24 个 HER2 对照玻片。192 个染色组织芯片切片中, 96 个使用 HER2 一抗染色, 另外 96 个用 HER2 阴性对照试剂染色。玻片使用同一批的试剂盒在这 3 个不同地点的 8 个独立批次中评定。

实验室间重复性检查中玻片评定显示可评估数据为 1477/1920(76.93%)。443 试验数据评分因以下原因不能评定:

a) 2/24 次 HER2 对照玻片性能不足导致 2 个批次/160 试验数据评分被移除。该情况在地点 A 发生一次, 地点 B 发生一次(每个检查地点去除 80 数据试验评分)。

b) 地点 C 偏离试验计划, 在本试剂盒染色后, 共有 24 个玻片人工使用苏木素进行复染。这导致 HER2 对照玻片和组织芯片 TMA 过度复染, 试验数据评分去除 240 数据评分。

c) 浸润性肿瘤丢失导致 23 个试验数据评分被去除。该情况在地点 A 发生了 23 次, 组织芯片 TMA 块中的组织丢失直接影响到完成此次检查所需的 192 个连续组织芯片 TMA 切片的生产。

d) 由于 BOND 全自动组织染色机冲洗不足产生的无法说明的染色, 导致 20 个数据评分被去除。

实验室间精密度测试中可说明的玻片评定显示 1477 个染色事件中发生了 79 个(5.28%)染色变化。其中, 14/1477 次(0.95%)显示从 0 变化到 1+或 2+变化到 3+, 这不代表从临床阳性转变为临床阴性, 反之亦然。通过值=99.05% (95%置信区间=98.42%到 99.46%)。14 次染色事件中, 5/1477

次 (0.34%) 染色时间发生在 Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (地点 A), 8/1477 次 (0.54%) 发生在地点 B, 1/1477 次 (0.07%) 发生在地点 C。

剩余 65/1477 次 (4.40%) 染色时间显示从 2+变为 1+或 2+变为 0, 因此代表在 2x2 数据评定中从临床阳性转变为临床阴性, 反之亦然。通过值=95.6% (95%置信区间=94.42%到 96.54%)。65 次临床显著变化中, 11/65 次 (16.9%) 发生在 Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (地点 A), 24/65 次 (36.9%) 发生在地点 B, 30/65 次 (46.1%) 发生在地点 C。在临床显著变化中, 从来没有 3+变到阴性 (0 或 1+) 的结果, 反之亦然。

E. 阅片者间重复性

随机选择 40 个每种 HER2 IHC 等级 (切除样本) 平等分布的浸润性乳腺癌病例, 连续切片, 供给 Leica Biosystems Newcastle Ltd (地点 A), 地点 B 和地点 C 作为染色和评分使用。切片被罩上, 打分之前在每个地点打乱随机。地点 B 和地点 C 这两个独立的临床地点之间的阅片人员间的符合率为 87.5% (95%CI: 73.3% ~ 95.8%)。地点 B、地点 C 与 Leica Biosystems Newcastle Ltd 之间的符合率分别为 92.5% (95%CI: 79.6% ~ 98.4%) 和 85% (95%CI: 70.1% ~ 94.29%)。三个阅片人员 (A, B, C) 之间总的符合率分析结果为 82.50%。

【注意事项】

仅供专业用户参考。

- 该产品中的一种或多种成份有害。
- 一般而言, 未满 18 岁的未成年人禁止使用该产品。用户必须按照正确的工作程序、注意产品的有害性和必要的安全须知进行操作。
- 本产品中 ProClin™950 的浓度最高为 0.35%, 未达到职业安全与卫生条例 (OSHA) 对有害物质提出的标准。您可从网站 www.leicabiosystems.com 获取一份材料安全数据表。
- 固定前、后的样本以及暴露于样本的所有材料, 应当按其具有传染性进行操作, 并采取适当措施进行处理。
- 不要用嘴吸取试剂, 避免试剂和样本接触皮肤和粘膜。若试剂或样本接触到敏感区, 需立刻用大量流水冲洗。即刻就医。向省, 市或者当地有关部门咨询有关潜在毒性成份的处理方法。
- 减少试剂微生物感染否则可能出现非特异性染色。







故障排查

问题	可能原因	修复措施
无特异性免疫组织化学染色	完成前运行中止	使用 BOND 软件, 确认是否有任何染色运行期间报告的错误以及 BOND 软件中所说明的地址。
	程序选择错误	确保添加玻片对话框的染色程序区域中 *IHC 程序 H 为合适的默认值。
	玻片脱蜡不足	确保添加玻片对话框的准备区域中选择了 *脱蜡模式。
	试剂分配量不当	确保所有 BOND 试剂都已分配到合适的容器中且放置在仪器上合适的位置。
	受到含叠氮化钠的 BOND 溶液污染	使用新的 BOND 溶液, 制备至合适的工作浓度。
特异性免疫组织化学染色弱	抗原决定簇修复不当	确保 BOND 抗原决定簇修复试剂已分配到正确的容器中, 且 BOND 软件默认到合适的抗原决定簇修复程序, *HIER 25 min with *ER1(97)。
	样本固定或处理不当	确保使用了福尔马林固定, 且组织处理程序与检测样本

		相适应。
	试剂盒过期	确保试剂盒在有效日期内使用。
特异性免疫组织化学染色过度	抗原决定簇修复不当	确保 BOND 抗原决定簇修复试剂已分配到正确的容器中，且 BOND 软件默认到合适的抗原决定簇修复协议，* HIER 25 min with *ER1(97) 。
	固定时有变化	确保使用了福尔马林固定，且组织处理程序与检测样本相适应。如果可以，使用其它蜡块重新试验病例。如果不可以，结合相应的 H&E 染色切片试验评价显示固定最佳的区域。
非特异性背景染色	试剂分配量不当	确保所有 BOND 试剂都已分配到合适的容器中且放置在仪器上合适的位置。
	玻片脱蜡不足	确保添加玻片对话框的准备区域中选择了* 脱蜡 模式。
	组织中发生非特异性免疫组织化学交叉反应	请参考 Bond Oracle HER2 IHC 试剂盒说明中有关正常组织交叉反应的部分（请参考表 7）。
	与组织坏死区域发生非特异性免疫组织化学交叉反应	确保使用了福尔马林固定，且处理计划与检测样本适应。如果可以，使用其他蜡块重新试验病例。如果不可以，结合相应的 H&E 染色切片试验评价显示固定最佳的区域。
	染色批次完成后样本干燥	如果玻片放在过夜的批次上，建议使用 BOND 延时启动功能。确保在此期间有足量的蒸馏水或去离子水可分配在玻片上，以保证玻片不干燥。
	使用淀粉添加剂后组织切片与玻片粘结	使用无淀粉的玻片（如 Leica BOND Plus Slides –产品代码 S21.2113）。
组织从病人/对照玻片脱片	玻片选择错误或切片晾干不足	确保病人/对照切片所用的玻片合适（如 Leica BOND Plus Slides –产品代码 S21.2113）。确保玻片充分晾干，且在 37°C 下孵育 12-18 小时（过夜）。需要更强粘着性的切片可以在 60°C 再孵育一小时。

如果发现任何与 **HER2** 试剂盒相关的问题不在本故障排查指南（请参考表 12）范围内，请与您当地的 Leica 技术服务部门或经销商联系。

【标识的解释】

标识	解释
	批号
	有效期至
	储存条件：2-8°C
	可回收利用
	参阅使用说明
	体外诊断试剂

【参考文献】

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. al. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:15s, (Abstr 4556).
4. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy resultst from the ToGA trial: A phase III study of 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;
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry* 2007 (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
23. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
24. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology* 2006.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: Leica Biosystems Newcastle Ltd

住所: Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne, NE12 8EW, United Kingdom

生产地址: Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne, NE12 8EW, United Kingdom

联系方式: +44 191 215 4242

售后服务单位名称: 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司

联系方式: 电话 021-63876606 传真 021-63876698

代理人的名称: 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司

住所: 上海市外高桥保税区富特北路 127 号 3 楼 C 部位

联系方式: 电话 021-63876606 传真 021-63876698

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注进 20153402948

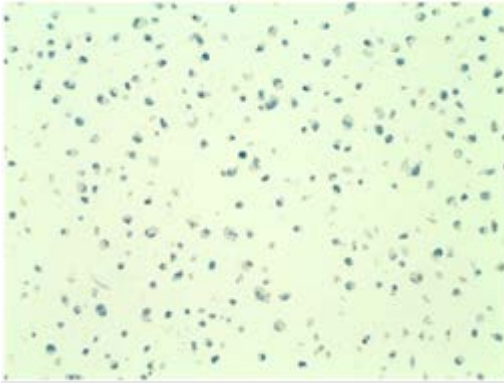
【说明书核准日期及修改日期】

2015 年 9 月 1 日

附录 染色示例

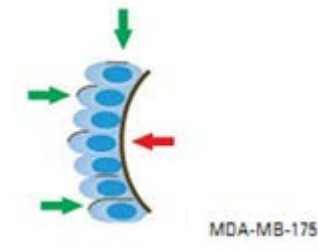
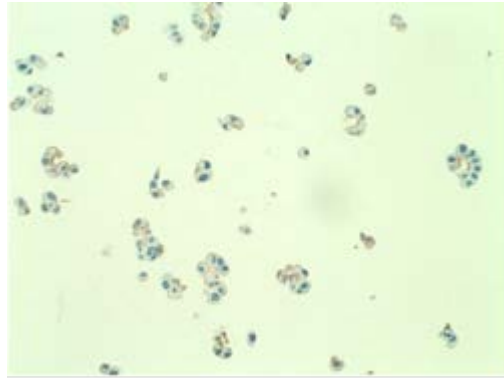
1. 试剂盒中 HER2 对照玻片（乳腺癌细胞系）的染色示例（放大倍数 20）

0



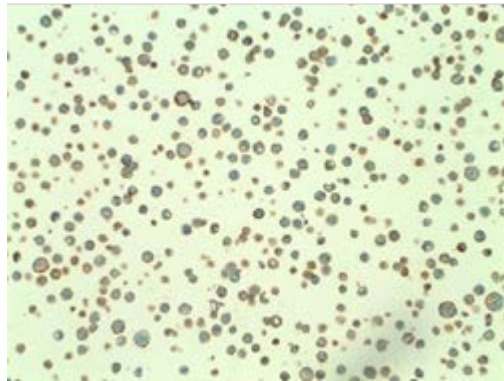
MDA-MB-231 细胞系无染色 (0)

1+



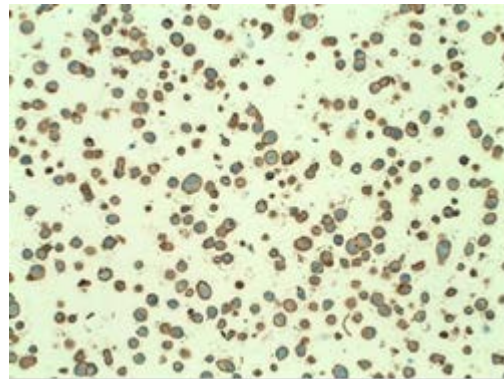
MDA-MB-175 细胞系的细胞膜呈现微弱/不完整的棕色染色 (1+)

2+



MDA-MB-453 细胞系的细胞膜呈现弱至中等强度的棕色、完整的细胞膜染色 (2+)

3+



SK-BR-3 细胞系的细胞膜呈现强的棕色、完整的细胞膜染色 (3+)

重要提示: MDA-MB-175 细胞系 (1+) 的特征是细胞成簇生长。



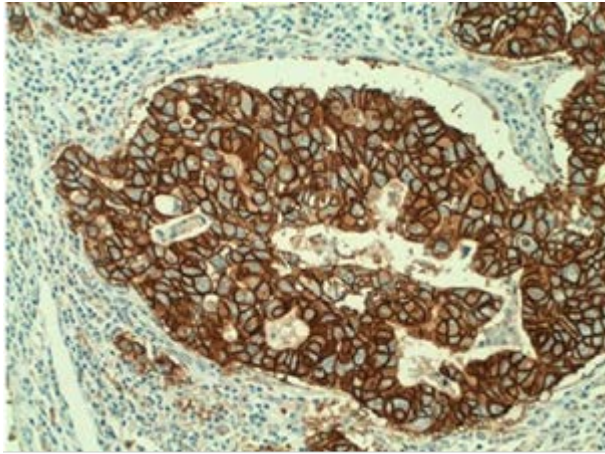
这些成簇细胞会生成管腔的刷状边缘。这些刷状边缘的染色比其他细胞膜的染色要强。



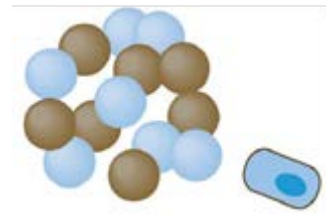
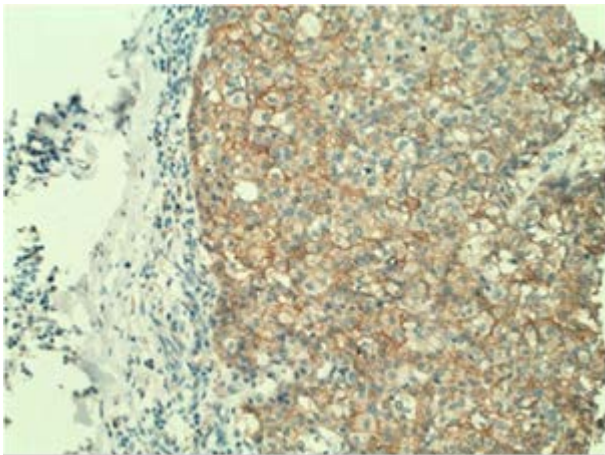
这些弱/几乎察觉不到的不完整的细胞膜染色才是正确的 HER2 蛋白 1+ 染色模式。

2. 乳腺癌组织的染色示例（放大倍数 20）

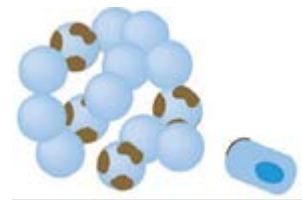
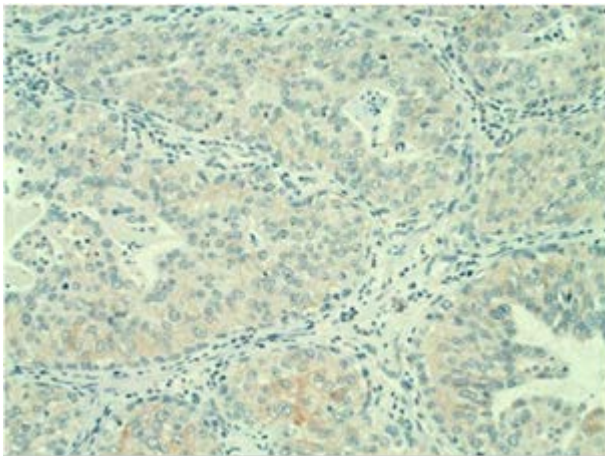
3+



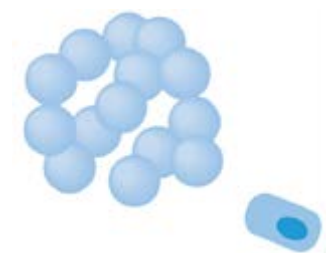
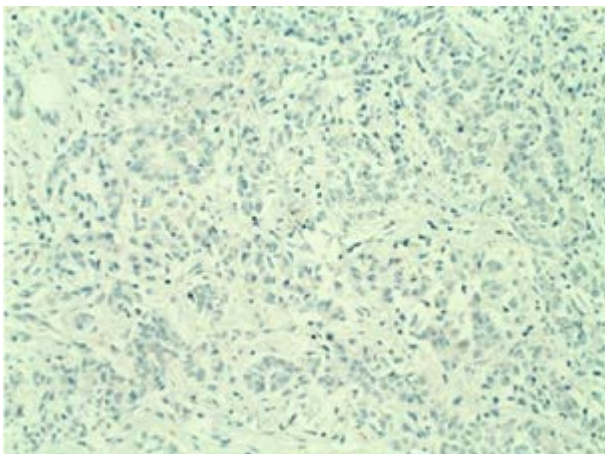
2+



1+



0



3. 胃癌组织的染色示例

0

1+

2+

3+

