

Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Mode d'emploi

Destiné au système de coloration avancé, entièrement automatisé, Leica Biosystems' BOND.

Ce produit (Product Code TA9145) est conçu pour la coloration de 60 tests (150 lames) :

60 lames test avec HER2 Primary Antibody

60 lames test avec HER2 Negative Control

15 lames de contrôle HER2 avec HER2 Primary Antibody

15 contrôles tissulaires positifs internes avec 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

Table des matières

Utilisation conforme de l'instrument	4
Résumé et explications	4
Données de base	4
Expression de HER2	5
Résumé de la concordance clinique	5
Principe de procédure	5
Composants fournis	6
Instructions d'utilisation	6
Stockage et stabilité	6
Préparation des échantillons	7
Avertissements et précautions	7
Procédure	8
A. Réactifs requis mais non fournis	8
B. Équipement requis mais non fourni	8
C. Méthodologie	8
D. Positionnement de la lame.....	8
E. Étapes de la procédure	9
Contrôle de qualité	11
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	12
Contrôle tissulaire positif interne– HER2 Primary Antibody	12
Composant tissulaire de contrôle négatif interne – HER2 Primary Antibody.....	13
Tissu du patient – HER2 Negative Control	13
Tissue du patient – HER2 Primary Antibody	13
Verification du test	13
Interprétation de la coloration - tissu mammaire	14
Interprétation de la coloration - tissu gastrique	15
Ordre rationnel de dépistage des lames	16
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody	16
2. Contrôle tissulaire positif interne – HER2 Primary Antibody	16
3. Composant tissulaire de contrôle négatif interne – HER2 Positive Control	16
4. Tissu du patient – coloration via HER2 Negative Control	16
5. Tissu du patient – coloré via l'HER2 Primary Antibody	16
Restrictions	16
A. Restrictions générales	16
B. Restrictions spécifiques au produit	17
Données de la lignée cellulaire	18
Concordance clinique de Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest - Tissu mammaire	18
Résultats de la concordance 2x2	19
Résultats de la concordance 3x3	20
Concordance clinique du Bond Oracle HER2 IHC System v PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Tissu mammaire	20
Résultats de la concordance 3x2	21
Concordance clinique du Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) - tissu gastrique	21
Résultats - Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) - tissu gastrique	22
Résultats de concordance 2x2	22
Résultats de concordance 3x3	22
Immunoréactivité – panel normal	24

Table des matières

Étude de reproductibilité	25
Tests de précision au sein des processus et entre les processus.....	25
A. Test de précision au sein des processus	25
B. Test de précision entre les processus.....	25
C. Reproductibilité lot à lot.....	26
D. Reproductibilité inter-laboratoire	26
E. Reproductibilité inter-observateurs	27
F. Précision inter-instruments (BOND-MAX v BOND-III)	27
Dépannage	28
Références	30

Utilisation conforme de l'instrument

Utilisation du diagnostic in vitro

Le Bond Oracle HER2 IHC System est un dispositif de test immunohistochimique (IHC) semi-quantitatif permettant de déterminer le statut de l'oncoprotéine HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) dans le tissu mammaire humain cancéreux et l'adénocarcinome gastrique (jonction gastro-oesophagienne incluse) traité par évaluation histologique. Le Bond Oracle HER2 IHC System apporte une aide à l'évaluation des patients recevant le traitement Herceptin® (trastuzumab) (voir la notice du médicament Herceptin®).

Remarque : Tous les patients soumis aux essais cliniques à l'Herceptin® ont été sélectionnés via un essai clinique de recherche immunocytochimique (CTA). Aucun de ces patients n'a été sélectionné à partir du Bond Oracle HER2 IHC System. La comparaison du Bond Oracle HER2 IHC System au Dako HercepTest™ à partir d'une série d'échantillons indépendants a révélé des résultats concordants acceptables, comme l'indique le résumé de concordance clinique. La corrélation effective du Bond Oracle HER2 IHC System avec le résultat clinique n'a pas été établie.

Tous les patients soumis aux essais cliniques à l'Herceptin® dans le cadre du cancer gastrique avancé (ToGA) ont été sélectionnés via le Dako HercepTest. Aucun de ces patients n'a été sélectionné à partir d'essais réalisés avec le Bond Oracle HER2 IHC System. La comparaison du Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) à partir d'une série d'échantillons indépendants a révélé des résultats concordants acceptables, comme l'indique le résumé de concordance clinique (tissu gastrique). La corrélation effective du Bond Oracle HER2 IHC System avec le résultat clinique n'a pas été établie.

Résumé et explications

Données de base

Le Bond Oracle HER2 IHC System contient l'anticorps anti-HER2, clone CB11, de souris monoclonale. Le clone CB11, développé à l'origine par Corbett et al (1), et fabriqué par Novocastra Laboratories Ltd (désormais Leica Biosystems Newcastle Ltd), est dirigé contre le domaine interne de l'oncoprotéine HER2.

Dans une proportion de patients du sein et de cancer de l'estomac, l'oncoprotéine HER2 est surexprimé dans le cadre du processus de transformation maligne et la progression tumorale (2). Statut HER2 a également été montré pour avoir des implications importantes pour le traitement du cancer gastrique (3). La surexpression de la protéine HER2 trouvée dans les cellules du cancer du sein suggère HER2 comme cible pour une thérapie à base d'anticorps, tandis que les résultats de l'essai ToGA indiquent clairement que l'utilisation d'Herceptin® dans le cancer gastrique ainsi que la chimiothérapie est un traitement efficace qui permet d'améliorer la survie globale HER2 dans les cancers gastriques positifs (4). Herceptin® est un anticorps monoclonal humanisé (5) qui se lie avec une grande affinité à la protéine HER2 et se est révélé inhiber la prolifération de cellules tumorales humaines qui surexpriment HER2 oncoprotéine la fois in vitro et in vivo (6-8).

Depuis la première méthode d'immunoperoxidase, décrite dans le rapport de Nakane et Pierce (9), de nombreux développements ont vu le jour dans le domaine de l'immunohistochimie, contribuant ainsi à une sensibilité accrue. L'utilisation du marquage polymère constitue l'un des développements récents réalisés dans ce domaine. Cette technologie a été appliquée à la fois à des anticorps primaires et à des systèmes de détection immunohistochimique (10). Le système de détection Compact Polymer™ utilisé par le Bond Oracle HER2 IHC System fait partie d'une gamme de technologies de polymérisation nouvelles et contrôlées, ayant été spécialement conçues pour préparer l'anticorps lié à la peroxydase de raifort (HRP). Comme la gamme de produits Oracle intègre cette technologie polymère, le problème de coloration par biotine endogène non spécifique constaté avec les systèmes de détection par streptavidine/biotine, n'apparaît pas ici.

Expression de HER2

L'oncoprotéine HER2 est exprimée à des niveaux détectables par immunohistochimie dans jusqu'à 20 % des adénocarcinomes de différents sites. Entre 10% et 20% des carcinomes canauxiers invasifs de la poitrine (11) et 20% des cancers gastriques (12-14) sont positifs pour HER2 oncoprotéine. 90 % des cas de carcinome canalaire in situ (DCIS) de type comédon sont positifs (15), ainsi que presque tous les cas de la maladie de Paget du sein (16).

Résumé de la concordance clinique

Le Bond Oracle HER2 IHC System a été conçu pour apporter une solution alternative à l'essai clinique de recherche (CTA) utilisé dans le cadre des recherches cliniques portant sur l'Herceptin®. La performance du Bond Oracle HER2 IHC System pour la détermination de la surexpression de l'oncoprotéine HER2 a été évaluée lors d'une étude indépendante comparant les résultats du système Bond Oracle HER2 IHC System à ceux du Dako HercepTest et portant sur 431 échantillons de tumeur mammaire d'origine américaine. Aucun de ces échantillons tumoraux n'a été prélevé sur des patients dans le cadre d'essais cliniques intégrant l'Herceptin®. Les résultats ont indiqué une concordance de 92,34 % dans une analyse 2x2 (intervalle de confiance à 95 % de 89,42 % à 94,67 %) et de 86,54 % dans une analyse 3x3 (intervalle de confiance à 95 % de 82,95 % à 89,62 %) entre les résultats des deux tests.

La performance du Bond Oracle HER2 IHC System pour la détermination de la surexpression de l'oncoprotéine HER2 sur l'adénocarcinome gastrique ((jonction gastro-oesophagienne incluse) a été évaluée lors d'une étude indépendante comparant les résultats du Bond Oracle HER2 IHC System à ceux de l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) et portant sur 287 échantillons de tumeur gastrique d'origine chinoise. Aucun de ces échantillons tumoraux n'a été prélevé sur des patients dans le cadre d'essais cliniques intégrant l'Herceptin®. Les résultats ont indiqué une concordance de 95,12 % dans une analyse 2x2 (intervalle de confiance à 95 % de 91,95 % à 97,31 %) et de 89,90 % dans une analyse 3x3 (intervalle de confiance à 95 % de 88,81 % à 93,13 %) entre les résultats du Bond Oracle HER2 IHC System et du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5).

Principe de procédure

Le Bond Oracle HER2 IHC System est doté de composants requis pour exécuter la procédure de coloration immunohistochimique pour tissus fixés au formol et enrobés de paraffine. Selon l'incubation avec l'HER2 Primary Antibody (clone CB11), ce système applique la technologie Compact Polymer prête à l'emploi. La conversion enzymatique du chromogène ajouté ultérieurement entraîne la formation d'un produit réactionnel visible au niveau du site antigénique. Les coupes tissulaires subissent ensuite une coloration de contraste, sont déshydratées, éclaircies puis montées. Les résultats sont interprétés via la microscopie optique. Des lames de contrôle comprenant quatre lignées cellulaires de cancer du sein humain, fixées au formol et enrobées de paraffine, sont fournies pour valider les colorations. Les quatre lignées cellulaires font apparaître l'expression de l'oncoprotéine HER2 aux intensités 0, 1+, 2+ et 3+. L'intensité de la coloration de ces lignées cellulaires est corrélée à la fois à la charge du récepteur de l'oncoprotéine HER2 par cellule et au statut de l'amplification génique HER2.

Le Bond Oracle HER2 IHC System (product code TA9145) est destiné au système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND de Leica Biosystems.

Composants fournis

Les matériaux répertoriés ci-dessous (Tableau 1) permettent de colorer 150 lames (60 lames test incubées avec HER2 Primary Antibody, 60 lames test correspondantes incubées avec HER2 Negative Control, 15 lames de contrôle HER2 incubées avec HER2 Primary Antibody et 15 contrôles tissulaires positifs internes incubés avec HER2 Primary Antibody). Le nombre de tests est basé sur l'utilisation d'une distribution automatique de 150 µL par lame. Les matériaux fournis dans le kit permettent de réaliser un maximum de 15 processus de coloration individuels BOND.

HER2 Control Slides, (x15)	Coupes de lignées cellulaires de cancer du sein humain fixées au formol, enrobées de paraffine qui démontrent l'expression de l'oncoprotéine HER2 à des intensités de coloration de 0, 1+, 2+ et 3+ en cas de coloration conforme au protocole fourni. Ces coupes adhèrent entièrement et n'ont pas besoin de séchage supplémentaire.
HER2 Primary Antibody, 13,5 mL	Contient l'anticorps monoclonal IgG de souris prêt à l'emploi et à affinité purifiée, clone CB11 et 0,035 % 2-méthylisothiazol-3(2H)-one.
HER2 Negative Control, 9 mL	Contient l'anticorps IgG de souris prêt à l'emploi à une concentration équivalente à HER2 Primary Antibody et 0,035 % 2-méthylisothiazol-3(2H)-one.
Peroxyde Block, 22,5 mL	Contient 3 à 4% de peroxyde d'hydrogène.
Post Primary, 22,5 mL	Anticorps IgG de lapin anti-souris (<10 µg/mL) dans une solution de tampon Tris NaCl contenant 10 % (v/v) de sérum animal et 0,01 % 2-méthylisothiazol-3(2H)-one.
Polymer, 22,5 mL	Anticorps de chèvre anti-lapin Poly-HRP (<25 µg/mL) dans une solution de tampon Tris NaCl contenant 10 % (v/v) de sérum animal et 0,01 % 2-méthylisothiazol-3(2H)-one.
DAB Part 1, 2,25 mL	Contient 66 mM de tétrachlorhydrate de diaminobenzidine 3,3' dans une solution stabilisatrice.
DAB Part B (x2), 22,5 mL	Contient ≤0,1% (v/v) de peroxyde d'hydrogène.
Hematoxylin, 22,5 mL	Contient <0,1 % d'hématoxyline.

Tableau 1. Composants du Bond Oracle HER2 IHC System

Instructions d'utilisation

Tous les réactifs fournis sont préparés pour être utilisés avec ce test et les numéros de lot attribués sont spécifiques à chaque Bond Oracle HER2 IHC System. Pour que le test soit valable, il ne faut procéder à aucune substitution.

Stockage et stabilité

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Replacer à une température entre 2 et 8 °C immédiatement après utilisation. Le non-respect de ces conditions entraîne l'invalidité du test. Vérifier que la date de péremption du Bond Oracle HER2 IHC System utilisé n'a pas expiré. Les signes indiquant une contamination et/ou une instabilité du Bond Oracle HER2 IHC System sont les suivants : turbidité des solutions, développement d'odeurs et présence de précipité. Il incombe à l'utilisateur de vérifier les conditions de stockage autres que celles susmentionnées.

Préparation des échantillons

Tous les échantillons doivent être préparés afin de préserver le tissu pour la coloration immunohistochimique. Il faut utiliser des méthodes de traitement standard des tissus pour tous les échantillons (17).

Il est recommandé de préparer les tissus dans des fixatifs à base de formol, de les traiter de façon routinière et de les enrober à la paraffine. Par exemple, la résection d'échantillon doit être bloquée dans une épaisseur de 3 à 4 mm et fixée pendant 18 à 24 heures dans du formol neutre tamponné à 10 %. Les tissus doivent ensuite être déshydratés dans de l'alcool, puis éclaircis au xylène, et enfin imprégnés de paraffine liquide et maintenus à une température ne dépassant pas 60 °C. L'épaisseur de coupe des échantillons tissulaires doit être comprise entre 3 et 5 µm.

Les lames requises pour l'évaluation de l'oncoprotéine HER2 et la vérification de la tumeur doivent être préparées en même temps. Afin de préserver l'antigénicité, les coupes tissulaires montées sur les lames (Leica BOND Plus Slides, réf. S21.2113 ou Apex BOND Slides réf. 3800040) doivent être colorées dans un délai de 4 à 6 semaines après la coupe quand elles sont stockées à température ambiante (18 à 24 °C). Après la coupe, il est recommandé de laisser les lames incuber pendant 12 à 18 heures (pendant la nuit) à 37 °C. Les coupes qui requièrent davantage d'adhérence peuvent être incubées à 60 °C pendant une heure supplémentaire.

Aux États-Unis, le Clinical Laboratory Improvement Act (loi relative à l'amélioration des laboratoires cliniques) de 1988 stipule dans l'article 42 CFR 493.1259(b) que « le laboratoire est tenu de conserver les lames colorées pendant une durée minimale de dix ans à compter de la date d'examen et de conserver les blocs d'échantillons pendant une durée minimale de deux ans à compter de la date d'examen. »

Avertissements et précautions

Uniquement pour les utilisateurs professionnels.

Le produit renferme un ou plusieurs produits dangereux.

Les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à travailler avec ce produit. Les utilisateurs doivent avoir reçu des instructions précises concernant la procédure, les propriétés dangereuses et les prescriptions de sécurité nécessaires.

Les symptômes de surexposition au ProClin™ 950, le préservateur utilisé dans les réactifs Oracle, peuvent inclure des irritations cutanées et oculaires ainsi qu'une irritation des membranes muqueuses et des voies respiratoires supérieures. La concentration de ProClin™ 950 dans ce produit s'élève à 0,35 % au maximum. Ces solutions ne répondent pas aux critères de l'OSHA (administration chargée de la santé et de la sécurité sur les lieux de travail) pour les substances dangereuses. Une Material Safety Data Sheet est disponible sur demande ou sur le site Internet www.LeicaBiosystems.com.

Les échantillons, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux exposés à ces échantillons, doivent être traités comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés avec les précautions qui s'imposent.

Ne jamais pipetter les réactifs à la bouche et veiller à éviter tout contact des réactifs et des échantillons avec la peau et les membranes muqueuses. Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec des zones sensibles, rincer abondamment à l'eau. Demander conseil à un médecin. Il convient de se renseigner sur les réglementations locales ou nationales en vigueur pour l'élimination de tout composant potentiellement toxique.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs afin d'éviter une augmentation de coloration non spécifique.

Procédure

A. Réactifs requis mais non fournis

- BOND Dewax Solution (réf. AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (réf. AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (réf. AR9590)
- Solvants standard utilisés en immunohistochimie (par ex. éthanol, absolu ou classé)
- Xylène (ou substitut de xylène)
- Milieu de montage
- Eau distillée ou eau déionisée

B. Équipement requis mais non fourni

- Système(s) de coloration avancé(s), entièrement automatisé(s), BOND-MAX et BOND-III de Leica Biosystems.
- BOND Universal Covertiles (réf. S21.2001, S21.4583 ou S21.4611)
- BOND Mixing Stations (réf. S21.1971)
- Étuve à air chaud, capable de maintenir une température de 60 °C
- Microscope optique (grossissement de l'objectif 4–40x)
- Lames (Leica BOND Plus Slides, réf. S21.2113 ou Apex BOND Slides réf. 3800040)
- Lamelles couvre-objet
- BOND Slide Label & Print Ribbon (réf. S21.4564)
- BOND Aspiring Probe Cleaning System (réf. CS9100)

C. Méthodologie

- Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir suivi une formation portant sur les techniques immunohistochimiques entièrement automatisées de BOND.
- Chaque coupe test à colorer avec HER2 Primary Antibody requiert une coupe identique pour la coloration avec HER2 Negative Control. La coupe de contrôle négatif permet de différencier la coloration spécifique de la coloration non spécifique sur le site antigénique. Chaque processus de coloration BOND doit inclure une HER2 Control Slide. Si, à la fin du protocole de coloration, les lignées cellulaires ne présentent pas les modèles de coloration corrects (voir Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), le processus doit être considéré comme non valide.

D. Positionnement de la lame

Un nouveau BOND Universal Covertile (réf. S21.2001, S21.4583 ou S21.4611) doit être utilisé pour chaque lame. L'emploi de BOND Universal Covertiles utilisés auparavant soit pour la coloration immunohistochimique soit pour l'hybridation in-situ n'a pas été validé avec ce test.

La disposition du plateau porte-lames (Tableau 2) permet une performance optimale du Bond Oracle HER2 IHC System et l'obtention des 60 tests.

Position de la lame	Description de la lame	Réactif	Type de tissu	Icône de la lame
1	Cas 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Cas 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Cas 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Cas 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Cas 1	*HER2PrimaryAntibody	Test	
6	Cas 2	*HER2PrimaryAntibody	Test	
7	Cas 3	*HER2PrimaryAntibody	Test	
8	Cas 4	*HER2PrimaryAntibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Positif	
10	Contrôle tissulaire interne	*HER2PrimaryAntibody	Positif	

Tableau 2. Disposition du plateau porte-lames, montrant le type de tissu et le réactif

E. Étapes de la procédure

Suivre les étapes indiquées ci-dessous pour placer le porte-lames dans la position décrite dans le tableau 2. Ces instructions doivent être lues en parallèle avec le BOND System User Manual.

1. Sur l'instrument BOND, vérifier que les conteneurs pour vrac et déchets dangereux ont suffisamment de capacité pour réaliser les processus de coloration requis.
2. Vérifier que les conteneurs de réactifs en vrac contiennent l'alcool adéquat, l'eau distillée ou déionisée appropriée, la BOND Dewax Solution (fournie en tant que solution prête à l'emploi), la BOND Epitope Retrieval Solution 1 (livrée prête à l'emploi) et la BOND Wash Solution (livrée sous forme concentrée x10) afin d'exécuter le processus de coloration requis.
3. Vérifier que la BOND Mixing Station installée est propre.
4. Allumer le système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND.
5. Allumer le contrôleur BOND relié au système de coloration avancé, entièrement automatisé, BOND.
6. Lancer le logiciel BOND.

7. Dans le cas d'un nouveau Bond Oracle HER2 IHC System, scanner le code-barres du plateau de réactifs avec le scanner à main pour entrer le système dans l'inventaire de réactifs BOND.
8. Accéder à l'écran de configuration de la lame, puis cliquer sur **Add case**.
9. Entrer les données du premier cas. Vérifier que le volume de distribution est réglé à 150 µL et que le protocole de préparation est ***Dewax**. Cliquer sur OK.
10. Une fois le cas mis en évidence sur l'écran de configuration de la lame, cliquer sur **Add slide**.
11. Commencer par ajouter les lames test des patients. Vérifier que le type de tissu est réglé sur **Test tissue**.
12. Confirmer que le volume de distribution est 150 µL et que le protocole de préparation est ***Dewax**.
13. Sélectionner les valeurs du mode de coloration **Single** et **Oracle** (ne pas cliquer sur **Oracle control**).
14. Sélectionner le processus **IHC**.
15. Sélectionner ***HER2 Negative Control** dans la liste des marqueurs. L'onglet Protocoles prend implicitement la valeur du protocole de coloration correct (***IHC Protocol H**) et protocole HIER (***HIER 25 min with ER1 (97)**).
16. Cliquer sur **Add slide**. La lame de réactif du contrôle négatif est créée.
17. Dans la boîte de dialogue Add slide, sélectionner ***HER2 Primary Antibody** depuis la liste des marqueurs. Les protocoles par défaut et tous les autres paramètres restent inchangés.
18. Cliquer sur **Add slide**. La lame test est créée.
19. Répéter les étapes 8 à 18 jusqu'à ce que tous les cas et toutes les lames test des patients soient créés.
20. Puis, créer la lame HER2 Control Slide. L'ajouter au dernier cas ou créer un nouveau cas pour les lames de contrôle en fonction des pratiques standard de votre laboratoire.
Remarque importante: Le Bond Oracle HER2 IHC System requiert l'intégration d'une HER2 Control Slide à chaque processus (c.-à-d. d'un plateau porte-lames) afin de valider le test.
21. Dans la boîte de dialogue Add slide, régler le type de tissu sur **Positive tissue**.
22. Cliquer sur **Oracle control**.
23. Sélectionner le numéro de lot de la HER2 Control Slide dans la liste Lot No. Le numéro de lot est inscrit dans la zone d'étiquette de la lame.
Remarque importante: La HER2 Control Slide doit provenir du même Bond Oracle HER2 IHC System qui sera utilisé.
24. Sélectionner ***HER2 Primary Antibody** depuis la liste des marqueurs. Conserver le volume de distribution, le mode de coloration, les paramètres du processus et du protocole.
25. Cliquer sur **Add slide** pour ajouter l'HER2 Control Slide.
26. Puis, ajouter une lame de contrôle tissulaire positif interne.
27. Désélectionner **Oracle control**.

28. Sélectionner ***HER2 Primary Antibody** depuis la liste des marqueurs. Conserver le volume de distribution, le mode de coloration, les paramètres du processus et du protocole. Le type de tissu reste **Positive tissue**.
29. Cliquer sur **Add slide**. La création de la lame est alors terminée.
30. Imprimer des étiquettes pour lames. Toutes les étiquettes pour lames Oracle portent la mention imprimée « OC ». L'étiquette de l'HER2 Control Slide comprend également le numéro de lot du Bond Oracle HER2 IHC System .
31. Étiqueter correctement les lames.
32. Ouvrir les couvercles de tous les conteneurs du Bond Oracle HER2 IHC System , puis charger le plateau à réactifs sur le BOND.
33. Placer les lames sur le plateau porte-lames selon l'ordre indiqué dans la section D, Tableau 2. Appliquer de nouveaux Couvertiles.
34. Charger le plateau porte-lames sur le BOND, puis appuyer sur le bouton **Load/Unload**.
35. Confirmer que les lames ont été scannées, puis cliquer sur le bouton **Run (Play)** sur l'écran de statut du système.
36. Vérifier que le champ d'indication du plateau affiche **Proc (OK)**, le numéro de séquence et l'heure de finition sont affichés.
37. Une fois le processus terminé, cliquer sur le bouton **Load/Unload**, puis extraire les plateaux porte-lames du BOND.
38. Retirer les Couvertiles, puis rincer les lames dans de l'eau déionisée.
39. Déshydrater, purger et monter les coupes.

Contrôle de qualité

Les différences concernant la fixation, le traitement et l'enrobage du tissu dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner une certaine variabilité des résultats, nécessitant une performance régulière des contrôles internes en plus des HER2 Control Slides fournies par Leica Biosystems' dans le Bond Oracle HER2 IHC System. Consulter les lignes d'orientation relatives au contrôle de qualité du College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry ; voir aussi CLSI (anciennement NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) et Special Report : Quality Control in Immunohistochemistry (18). Se référer également au Tableau 3 ci-dessous pour les types de contrôles de qualité immunohistochimiques et leurs fonctions.

Échantillon*	Description	Coloration par HER2 Primary Antibody	Coloration par HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	Comme fourni dans le Bond Oracle HER2 IHC System.	Contrôle la procédure de coloration et indique la validité de la performance du réactif.	
Contrôle tissulaire positif interne	Tissu renfermant l'antigène cible. Le contrôle idéal doit faire apparaître une coloration tissulaire faiblement positive de sorte à pouvoir définir les changements subtiles de la sensibilité de l'anticorps primaire.	Contrôle toutes les étapes de l'analyse. Valide la préparation du tissu et la performance de coloration du Bond Oracle HER2 IHC System.	Détection de coloration de fond non spécifique
Composant tissulaire de contrôle négatif interne	Tissus ou cellules devant être négatifs (ont pu être localisés dans le tissu du patient ou dans les composants tissulaires du contrôle positif/négatif).	Détection d'une réactivité croisée d'anticorps non spécifiques avec des cellules/composants cellulaires.	

*Fixé et traité selon l'échantillon patient

Tableau 3. Les contrôles de qualité immunohistochimique et leurs fonctions

Le tissu de contrôle doit provenir d'une biopsie ou d'échantillons chirurgicaux, fixés au formol, traités et enrobés de paraffine dès que possible, et ce de la même manière que les échantillons du patient. Les échantillons doivent être préparés de façon appropriée afin de préserver l'antigénicité du tissu pour la coloration immunohistochimique. Il faut utiliser des méthodes de traitement standard des tissus pour tous les échantillons (17).

HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Chacune des HER2 Control Slides fournies contient quatre coeurs de lignées cellulaires de cancer du sein humain, fixés au formol, enrobés de paraffine avec des intensités de coloration de 0, 1+, 2+ et 3+. Une lame doit être incluse à chaque test (c.-à-d. au plateau porte-lames). L'évaluation correcte de la HER2 Control Slide fournie par Leica Biosystems indique la validité du test (voir le Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Les HER2 Control Slides fournies avec ce système valident uniquement la performance du réactif, elles ne vérifient pas la préparation du tissu.

Contrôle tissulaire positif interne– HER2 Primary Antibody

Si des composants tissulaires de contrôle positif interne sont utilisés, ils doivent provenir d'une biopsie ou d'échantillons chirurgicaux, fixés au formol, traités et enrobés de paraffine dès que possible, et ce de la même manière que les échantillons du patient. Les contrôles tissulaires positifs constituent une indication relative à la préparation correcte des tissus et aux techniques de coloration valables. Au moins un composant de contrôle positif doit être inclus pour chaque test. La coupe de contrôle positif doit faire apparaître la coloration positive faible de sorte à pouvoir définir les changements subtiles de la sensibilité de l'anticorps primaire.

Remarque : Les composants tissulaires du contrôle positif connus ne doivent être utilisés que pour le contrôle de performance correct des tissus traités avec des réactifs test, et NON pour formuler une interprétation spécifique des échantillons du patient. Si le tissu de contrôle positif ne parvient pas à faire apparaître la coloration positive appropriée, les résultats obtenus avec les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Un bloc de contrôle multitissulaire contenant des tumeurs et représentant les 4 degrés de HER2 peut également être utilisé de façon efficace comme matériau de contrôle interne approprié.

Composant tissulaire de contrôle négatif interne – HER2 Primary Antibody

Si des composants tissulaires de contrôle négatif interne sont utilisés, ils doivent provenir d'une biopsie fraîche ou d'échantillons chirurgicaux, fixés, traités et enrobés de paraffine dès que possible, et ce de la même manière que les échantillons du patient. L'utilisation du tissu de contrôle, connu comme étant l'oncoprotéine HER2 négative, lors de chaque processus de coloration vérifie la spécificité de l'anticorps primaire et fournit une indication sur toute coloration de fond non spécifique. La variété des différents types de cellules présents dans la plupart des coupes tissulaires offre des sites de contrôles négatifs internes (à vérifier par l'utilisateur). Les canaux galactophores normaux n'étant pas associés à une tumeur peuvent constituer une référence pour la validité du test. En cas de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif interne, les résultats des échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Le bloc de contrôle multitissulaire représentant les quatre degrés de HER2 peut être utilisé à des fins de contrôle tissulaire négatif et positif.

Tissu du patient – HER2 Negative Control

Utiliser le HER2 négatif Control à la place de l'HER2 Primary Antibody sur une coupe correspondante pour chaque test patient afin d'évaluer la coloration non spécifique, et de permettre une interprétation exacte de la coloration spécifique de l'oncoprotéine HER2 au niveau du site antigénique.

Tissu du patient – HER2 Primary Antibody

L'intensité de la coloration positive doit être évaluée dans le cadre d'une coloration de fond non spécifique avec le HER2 Negative Control. Comme pour tout test immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté et non que l'antigène n'était pas présent dans les cellules/le tissu évalué(es). Consulter aux rubriques Ordre rationnel du dépistage des lames, Restrictions, Évaluation de la performance et Immunoréactivité pour davantage d'informations concernant l'immunoréactivité du Bond Oracle HER2 IHC System.

Vérification du test

Avant la première utilisation d'un anticorps ou d'un système de coloration dans une procédure de diagnostic, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant sur une série de tissus internes dotés de profils immunohistochimiques positifs et négatifs connus. Consulter la rubrique Contrôle de qualité comme indiqué précédemment et les exigences requises pour le CAP Certification Program for Immunohistochemistry et/ou CLSI (anciennement NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17). Ces procédures de contrôle de qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou en cas de changement des paramètres du test. Les cancers du sein canaux invasifs (infiltrant) avec des intensités de coloration de l'oncoprotéine HER2 connues variant de 0 à 3+ et d'autres tissus négatifs appropriés conviennent à la vérification du test.

Interprétation de la coloration - Tissu mammaire

Pour déterminer l'expression de l'oncoprotéine HER2, il suffit d'évaluer le schéma et l'intensité de coloration de la membrane au moyen de l'échelle présentée dans le tableau 4. L'évaluation de la lame sera effectuée par un pathologiste se servant d'un microscope à fond clair. Pour l'évaluation de la coloration et de la notation immunohistochimique, il convient d'utiliser un objectif de grossissement 10x. L'utilisation d'un objectif de grossissement 20x–40x doit servir à confirmer la notation. La coloration cytoplasmique doit être considérée comme une coloration non spécifique et ne doit pas être incluse dans l'évaluation de l'intensité de coloration de la membrane (19). Pour mieux différencier les colorations 0, 1+, 2+, et 3+, consulter les images représentatives des intensités de coloration du Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide. Seuls les échantillons de patients souffrant d'un cancer du sein invasif doivent être notés. Si un carcinome *in situ* et un carcinome invasif sont détectés dans le même échantillon, seul l'élément invasif doit être noté.

Schéma de coloration immunohistochimique	Score	Évaluation
Aucune coloration n'est observée ou une coloration de la membrane est observée dans moins de 10 % des cellules tumorales.	0	Négatif
Une coloration de la membrane très faible/à peine visible est détectée dans plus de 10 % des cellules tumorales. Seule une partie de la membrane des cellules est colorée.	1+	Négatif
Une coloration faible à modérée de la membrane est observée dans plus de 10 % des cellules tumorales.	2+	Équivoque (faiblement positif)
Une forte coloration complète de la membrane est observée dans plus de 10 % des cellules tumorales.	3+	Fortement positif

Table 4. Interprétation de la coloration HER2

Les résultats de coloration du Bond Oracle HER2 IHC System sont interprétés comme étant négatifs pour l'expression de l'oncoprotéine HER2 en cas de notations d'intensité de coloration de 0 et 1+, équivoques (faiblement positifs) en cas de notation d'intensité de coloration de 2+, et fortement positifs en cas de notation d'intensité de coloration de 3+. Le Bond Oracle HER2 IHC System n'est pas conçu pour fournir des pronostics au patient ou au médecin et n'a pas été validé pour cette fonction. Pour chaque évaluation de coloration, les lames doivent être examinées dans l'ordre présenté ci-dessous afin de déterminer la validité du processus de coloration et de permettre une évaluation semi-quantitative de l'intensité de coloration du tissu de l'échantillon.

Interprétation de la coloration - tissu gastrique

Pour déterminer l'expression de l'oncoprotéine HER2, il suffit d'évaluer le schéma et l'intensité de coloration de la membrane au moyen de l'échelle présentée dans les tableaux 5 et 6. L'évaluation de la lame sera effectuée par un pathologiste se servant d'un microscope à fond clair. Pour l'évaluation de la coloration et de la notation immunohistochemique, il convient d'utiliser un objectif de grossissement 10x. L'utilisation d'un objectif de grossissement 20x–40x doit servir à confirmer la notation. La coloration cytoplasmique doit être considérée comme une coloration non spécifique et ne doit pas être incluse dans l'évaluation de l'intensité de coloration de la membrane (15). Pour mieux différencier les colorations 0, 1+, 2+, et 3+, consulter les images représentatives des intensités de coloration du Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide. Seuls les échantillons des patients souffrant d'un adénocarcinome gastrique ou d'une jonction gastro-oesophagienne doivent être notés.

	Schéma de coloration immunohistochemique	Score	Évaluation
Échantillons chirurgicaux	Aucune coloration n'est observée ou une coloration de la membrane est observée dans moins de 10% des cellules tumorales.	0	Négatif
	Une coloration de la membrane très faible/à peine visible est détectée dans plus de 10% des cellules tumorales. Seule une partie de la membrane des cellules est colorée.	1+	Négatif
	Une coloration complète, faible à modérée, de la membrane basolatérale ou latérale est observée dans 10% ou plus des cellules tumorales.	2+	Équivoque (faiblement positif)
	Une forte coloration complète de la membrane basolatérale ou latérale est observée dans plus de 10% des cellules tumorales.	3+	Fortement positif

Tableau 5. Interprétation de la coloration HER2 dans les échantillons chirurgicaux de cancer gastrique

	Schéma de coloration immunohistochemique	Score	Évaluation
Échantillons de biopsie	Aucune coloration n'est observée dans les cellules tumorales	0	Négatif
	Des amas cellulaires tumoraux faisant apparaître une coloration très faible/à peine visible de la membrane sont observés, indépendamment du pourcentage des cellules colorées	1+	Négatif
	Des amas cellulaires tumoraux faisant apparaître une coloration faible à modérée complète de la membrane basolatérale ou latérale sont observés, indépendamment du pourcentage des cellules colorées	2+	Équivoque (faiblement positif)
	Des amas cellulaires tumoraux faisant apparaître une forte coloration complète de la membrane basolatérale ou latérale sont observés, indépendamment du pourcentage des cellules colorées	3+	Fortement positif

Tableau 6. Interprétation de la coloration HER2 dans les échantillons de biopsie des cancers gastriques

Pour l'interprétation des biopsies colorées du Bond Oracle HER2 IHC System, il est conseillé d'utiliser un amas d'au moins cinq cellules tumorales.

Ordre rationnel de dépistage des lames

Les lames doivent être dépistées dans l'ordre suivant :

1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Un test valide effectué avec Oracle HER2 Control Slide se présente comme suit :

- Présence d'une forte coloration brune complète de la lignée cellulaire de contrôle 3+ SK-BR-3.
- Présence d'une coloration brune faible à modérée complète de la membrane cellulaire dans la lignée cellulaire de contrôle 2+, MDA-MB-453.
- Présence d'une coloration brune très faible/à peine visible et incomplète de la membrane cellulaire dans la lignée cellulaire de contrôle 1+, MDA-MB-175.
- Pas de coloration dans la lignée cellulaire de contrôle 0, MDA-MB-231.

Remarque importante : La lignée cellulaire de contrôle 1+, MDA-MB-175, se caractérise par un modèle de croissance distinct dans lequel les cellules forment des agrégats. Ces agrégats font apparaître une zone de bordure en brosse luminale continue dans l'amas cellulaire. La coloration de cette bordure en brosse est plus forte que pour le reste de la membrane cellulaire. La coloration très faible/à peine visible et incomplète de la membrane cellulaire est le schéma de coloration correct de l'oncoprotéine HER2 (1+). L'immunocoloration à points de la région de Golgi dans le cytoplasme peut également être observée dans cette lignée cellulaire.

2. Contrôle tissulaire positif interne – HER2 Primary Antibody

La PRÉSENCE d'une coloration brune de la membrane doit être observée en fonction du statut de l'oncoprotéine HER2 connue du contrôle positif choisi.

3. Composant tissulaire de contrôle négatif interne – HER2 Positive Control

L'ABSENCE de coloration de la membrane doit être observée. Un composant tissulaire de contrôle négatif confirme le manque de réactivité croisée du système de détection face aux cellules/composants cellulaires cibles spécifiques. En cas de coloration de la membrane dans un composant tissulaire de contrôle négatif, l'échantillon du patient doit être considéré comme non valide.

4. Tissu du patient – coloration via HER2 Negative Control

L'ABSENCE de coloration de la membrane vérifie l'étiquetage spécifique de l'antigène cible par l'anticorps primaire. Toute autre coloration brune apparaissant dans le cytoplasme de l'échantillon traité avec le HER2 Negative Control, comme dans un tissu conjonctif, des leucocytes, des érythrocytes ou dans un tissu nécrotique, doit être considérée comme une coloration de fond non spécifique et doit être notée.

5. Tissu du patient – coloré via l'HER2 Primary Antibody

Les niveaux d'expression de l'oncoprotéine HER2 sont déterminés par les critères définis à la fois dans le tableau 4-6 et dans le Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

Restrictions

A. Restrictions générales

L'immunohistochimie est une technique de laboratoire multi-étapes permettant d'interpréter et de déterminer les caractéristiques histopathologiques. Cette technique requiert une formation spéciale pour tous les aspects de la procédure (y compris la sélection des réactifs appropriés, du tissu, de la fixation, du traitement et de la préparation de la lame IHC) et de l'interprétation.

La coloration immunohistochimique du tissu dépend de la manipulation, de la fixation et du traitement du tissu avant la coloration. Une fixation, une congélation, une décongélation,

un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe incorrects ou une contamination avec d'autres tissus ou fluides risquent de produire un artéfact, un piégeage de l'anticorps ou des résultats faussement négatifs. Des résultats non homogènes peuvent provenir des variations des méthodes de fixation, d'enrobage, ou à des irrégularités inhérentes au tissu (21). Une coloration de contraste excessive ou incomplète peut également compromettre l'interprétation correcte des résultats.

En cas de coloration non spécifique, celle-ci a généralement une apparence diffuse. La coloration sporadique des tissus conjonctifs s'observe également dans les sections des tissus ayant subi une fixation au formol excessive. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées font souvent apparaître une coloration non spécifique (22). Des résultats faussement positifs peuvent être provoqués par une liaison non immunologique de protéines ou des produits de réaction au substrat. Ils peuvent aussi être dus à des enzymes endogènes comme le pseudoperoxydase (érythrocytes) ou une peroxydase endogène (cytochrome C), selon le type de coloration immunohistochimique utilisé.

Les tissus des patients infectés par le virus de l'hépatite B et l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) peuvent présenter une coloration non spécifique avec du peroxydase de raifort (23).

Une coloration immunohistochimique inattendue ou des variations de coloration peuvent résulter d'altérations des niveaux d'expression des gènes ou antigènes de codage. Tout changement des schémas de coloration attendus doit être interprété en association avec tous les examens diagnostiques.

L'interprétation de la coloration immunohistochimique doit être complétée par des études morphologiques et l'utilisation de matériel de contrôle approprié, et doit, en outre, être évaluée en fonction de l'anamnèse du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

La performance du test (c.-à-d. l'évaluation de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs) et l'interprétation de toute coloration immunohistochimique ou de l'absence de coloration doivent être réalisées dans un laboratoire accrédité/licencié conformément à la législation en vigueur et placé sous le contrôle d'un pathologiste justifiant des qualifications et de l'expérience nécessaires, ce pathologiste étant responsable de l'évaluation générale du test immunohistochimique et de son interprétation.

B. Restrictions spécifiques au produit

Ce produit n'est pas destiné à être utilisé pour la cytométrie en flux. Les caractéristiques de performance n'ont pas été déterminées pour la cytométrie en flux.

Des résultats faussement négatifs peuvent être considérés comme le résultat de la dégradation d'antigènes dans la coupe tissulaire. Les lames requises pour l'évaluation de l'oncoprotéine HER2 et la vérification de la tumeur doivent être préparées en même temps. Afin de préserver l'antigénicité, les coupes tissulaires disposées sur les lames (Leica BOND Plus Slides, réf. S21.2113 ou Apex BOND Slides réf. 3800040) doivent être colorées dans un délai de 4 à 6 semaines après la coupe et stockées à température ambiante (18–24 °C). Après la coupe, il est recommandé de laisser les lames incuber pendant 12 à 18 heures à 37 °C. Les coupes qui requièrent davantage d'adhérence peuvent être incubées à 60 °C pendant une heure supplémentaire.

Une variation naturelle minimale du profil immunohistochimique sera observée entre les séquences de croissance des lignées cellulaires utilisées dans le Bond Oracle HER2 IHC System. Cette variation naturelle se situe dans des plages de tolérance acceptables d'une entité biologique et n'affecte pas l'interprétation ni la performance du système.

La caractérisation des lignées cellulaires utilisant à la fois la cytométrie en flux et l'hybridation in situ comme présentée dans le tableau 7 est également soumise à la variation biologique naturelle. La variation technique et la variation de l'interprétation des lignées cellulaires de contrôle telles qu'elles ont été évaluées par l'hybridation fluorescente in situ font également l'objet d'un rapport (24).

L'évaluation des HER2 Control Slides doit tenir compte de toutes les dates de péremption pertinentes. Stocker le Bond Oracle HER2 IHC System à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. Replacer à une température entre 2 et 8 °C immédiatement après utilisation. Le non-respect de ces conditions entraîne l'invalidité du test.

Ne pas remplacer les réactifs du Bond Oracle HER2 IHC System par d'autres composants fournis soit par Leica Biosystems* soit par d'autres fabricants. Cela aurait pour effet d'invalider le test.

Il est important d'exécuter dans l'ordre prescrit toutes les étapes mentionnées dans les sections C à E (Procédure). Le non-respect de cet ordre entraîne l'invalidité du test.

Il est important d'utiliser des tissus uniquement fixés dans des fixatifs à base de formol pour l'essai. L'utilisation de tout autre type de fixatif aura pour effet d'invalider le test.

Les coupes tissulaires dépassant les plages d'épaisseur recommandées n'ont pas été validées. Toute autre épaisseur de coupe aura pour effet d'invalider le test.

Données de la lignée cellulaire

Lignée cellulaire	Profil du Bond Oracle HER2 IHC System	Charge du récepteur HER2 par cellule*	Statut de l'amplification génique HER2 ⁺	
			Nombre de copies de HER2	Rapport du gène HER2: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

Analyse de la charge du récepteur HER2, telle que déterminée par la cytométrie en flux. Le statut de l'amplification génique HER2 tel qu'il est déterminé par la sonde double (HER2 :Chromosome 17) FISH.

Tableau 7. Profil de HER2 Control Slide

Concordance clinique de Bond Oracle HER2 IHC System v Dako HercepTest - Tissu mammaire

La première partie de l'étude a été consacrée à l'examen d'aptitude du Bond Oracle HER2 IHC System en tant que dispositif d'aide à la détermination du traitement Herceptin® (trastuzumab). L'étude avait pour objectif d'examiner la concordance entre le Bond Oracle HER2 IHC System et le Dako HercepTest, considéré comme l'« étalon-or » pour ce test. Le critère d'acceptation défini impliquait une concordance générale supérieure à 75 % entre les deux tests avec un intervalle de confiance (CI) à 95 %.

L'étude réalisée était une évaluation à l'insu effectuée sur deux sites aux États-Unis. Chaque site examiné a reçu des échantillons de cancer du sein du statut HER2 connu, fixés au formol et enrobés de paraffine. Les cas ont été sélectionnés dans l'ordre inverse consécutif des archives cliniques représentant le flux consécutif des cas dans un département histopathologique d'essai clinique, et ont été testés indépendamment d'autres pronostics et/ou de facteurs prédictifs, sans influencer la cohorte. Les cohortes de 160 et 292 échantillons ont été testées respectivement sur le Site 1 et le Site 2. Chaque cohorte affichait une représentation égale des cas équivoques/positifs (2+, 3+) et négatifs (0, 1+), basés sur les notations HER2 IHC attribuées, représentant ainsi un total de 452 échantillons examinés. Douze échantillons (12) ont été considérés comme inappropriés en raison de l'insuffisance de la tumeur invasive et ont été retirés de l'examen.

Neuf (9) autres échantillons n'ont pas pu être notés compte tenu d'un lissage tissulaire de la surface de la lame, donnant ainsi un total de 431 échantillons pour l'examen final.

Tous les cas ont été colorés avec HercepTest conformément aux instructions du fabricant précisées dans la notice. Les coupes séquentielles de chaque cas ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé Leica Biosystems' BOND. Tous les cas étaient séparés des informations d'identification patients uniques et étaient accompagnés de données cliniques relatives à la taille, à l'état et au degré de la tumeur et à l'état du récepteur aux oestrogènes.

Toutes les lames colorées ont été masquées et notées de manière aléatoire par des observateurs formés sur deux sites. Pour une analyse de concordance 2x2, les notations ont été interprétées comme étant négatives si l'intensité de la coloration était de 0 ou 1+, et positives pour une intensité de 2+ ou 3+. Pour une analyse de concordance 3x3, les notations ont été interprétées comme étant négatives si l'intensité de la coloration était de 0 ou 1+, équivoques pour une intensité de 2+ et positives pour une intensité de 3+. Les données ont ensuite été analysées afin de vérifier la concordance de la coloration positive et la concordance de la coloration négative.

Résultats de la concordance 2x2

Dans cette analyse primaire, les résultats des deux tests (Bond Oracle HER2 IHC System et Dako HercepTest) sont classés comme étant négatifs (0, 1+) ou positifs (2+, 3+). Les fréquences des quatre combinaisons possibles sont affichées dans un format de tableau 2x2 (voir Tableau 8). Puis, le taux de concordance générale basé sur ce tableau 2x2 a été calculé selon un intervalle de confiance exact à 95 % (basé sur la distribution binomiale).

L'hypothèse nulle (H_0), s'opposant aux critères de réussite, suppose que la concordance ne dépasse pas 75 %.

L'observation des 431 échantillons des deux tests réalisés dans le cadre d'une analyse 2x2 a indiqué une concordance de 92,34 % (398/431) avec un CI à 95 %, de 89,42 % à 94,67 %. Ces données soutiennent le rejet de l'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle la concordance ne dépassait pas 75 % avec une valeur $p < 0,0001$.

Le pourcentage de concordance positive (sensibilité) ou l'aptitude du Bond Oracle HER2 IHC System à identifier correctement les cas positifs de l'HercepTest (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et l'HercepTest sur tous les cas positifs de l'HercepTest était de 84,87 % (129/152) avec un CI à 95 %, de 78,17 % à 90,16 %. Le pourcentage de concordance négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les cas négatifs de l'HercepTest (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par l'HercepTest sur tous les cas négatifs de l'HercepTest était de 96,42 % (269/279) avec un CI à 95 %, de 93,51 % à 98,27 %.

		HercepTest		
		Négatif	Positif	Totaux
Bond Oracle HER2 IHC System	Négatif	269	23	292
	Positif	10	129	139
	Totaux	279	152	431

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

Tableau 8. Concordance 2x2 du Bond Oracle HER2 IHC System avec l'HercepTest

Résultats de la concordance 3x3

Les données ont été regroupées dans les catégories négative (0 ou 1+), équivoque (2+) ou positive (3+) pour l'analyse 3x3 et ont indiqué une concordance de 86,54 % (373/431) avec un CI à 95 %, de 82,95 % à 89,62 %. L'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle la concordance ne dépassait pas 75 % a donc été exclue avec une valeur $p < 0,0001$.

Dans cette étude, le pourcentage de concordance positive pour 3+ (le pourcentage des échantillons ayant reçu la notation 3+ positive à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par l'HerceptTest sur tous les cas 3+ positifs de l'HerceptTest était de 73,33 % (66/90) avec un CI à 95 %, de 62,97 % à 82,11 %. Le pourcentage de concordance négative était de 96,42 % (269/279) avec un CI à 95 %, de 93,51 % à 98,27 %. Voir Tableau 7.

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

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

Tableau 9. Concordance 3x3 du Bond Oracle HER2 IHC System avec l'HercepTest

En conclusion, les données obtenues dans la présente étude ont démontré que le Bond Oracle HER2 IHC System peut être utilisé comme dispositif d'aide à la détermination du traitement à Herceptin® (trastuzumab), du fait de sa concordance élevée avec l' HercepTest.

Concordance clinique du Bond Oracle HER2 IHC System v PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Tissu mammaire

La deuxième partie de l'étude a pour l'objectif d'examiner la concordance entre le Bond Oracle HER2 IHC System et le Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considéré comme l'« étalon-or » pour le test d'évaluation génique utilisé en association avec l'immunohistochimie HER2 .

Cette étude a été réalisée sur les mêmes sites d'examen et a utilisé la même cohorte d'étude que dans la 1re partie. Tous les cas ont été colorés avec le Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit conformément aux instructions du fabricant précisées dans la notice. Les coupes séquentielles de chaque cas ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé BOND (1re partie de l'étude clinique). Parmi les 431 cas, trois n'ont fourni aucun résultat en raison d'une hybridation insuffisante de la sonde, la cohorte totale était donc composée de 428 cas.

Toutes les lames colorées ont été notées par des observateurs formés sur deux sites d'examen. Pour l'analyse de concordance 3x2, les notations étaient interprétées comme étant négatives si le rapport d'amplification du gène HER2/CEP17 était inférieur à (<) 2,0 et positives si le rapport était supérieur ou égal à (>) 2,0, pour un nombre de 20 cellules tumorales.

Résultats de la concordance 3x2

L'observation des 428 échantillons des deux tests réalisés dans le cadre d'une analyse 3x2 a indiqué une concordance de 87,6 % (375/428) avec un CI à 95 %, de 84 % à 90 %.

Le pourcentage de concordance positive (sensibilité) ou l'aptitude du Bond Oracle HER2 IHC System à identifier correctement les cas positifs de PathVysion (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par PathVysion sur tous les cas positifs de PathVysion positive cases) était de 93,8 % (61+/30/97) avec un CI à 95 %, de 86,8 % à 97,4 %.

Le pourcentage de concordance négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les cas négatifs de PathVysion (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par PathVysion sur tous les cas négatifs de PathVysion) était de 85,8 % (284/331) avec un CI à 95 %, de 81,6 % à 89,2 %. Voir Tableau 10.

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

Concordance générale (CI à 95 %) = 87,6 % (84 à 90 %)

Tableau 10. Concordance 3x2 du système de coloration Bond Oracle HER2 IHC System par rapport au PathVysion HER-2 DNA Probe kit.

Concordance clinique du Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) - Tissu gastrique

L'objectif de la 3e partie de cette étude consistait à générer des données à partir d'échantillons fixés au formol et enrobés de paraffine, provenant d'un cancer gastrique au stade avancé, afin d'examiner la concordance entre le système entièrement automatisé Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND, avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5). Le critère d'acceptation défini pour la troisième partie impliquait une concordance générale supérieure à 75% entre les deux tests.

Pour une analyse de concordance 2x2, les notations ont été interprétées comme étant négatives si l'intensité de la coloration était de 0 ou 1+, et positives pour une intensité de 2+ ou 3+. Pour une analyse de concordance 3x3, les notations ont été interprétées comme étant négatives si l'intensité de la coloration était de 0 ou 1+, équivoques pour une intensité de 2+ et positives pour une intensité de 3+. Les données ont ensuite été analysées afin de vérifier la concordance de la coloration positive et la concordance de la coloration négative.

Résultats - Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) - tissu gastrique

Résultats de la concordance 2x2

La concordance entre le système entièrement automatisé Bond Oracle HER2 IHC System, utilisant le système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND et le Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) a été réalisée sur 287 échantillons.

La concordance observée entre les deux tests dans une analyse 2x2 était de 95,12 % (273/287) avec un CI à 95 %, de 91,95 % à 97,31 %. Ces données soutiennent le rejet de l'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle la concordance ne dépassait pas 75 % avec une valeur $p < 0,0001$. Le pourcentage de concordance positive (sensibilité) ou l'aptitude du Bond Oracle HER2 IHC System à identifier correctement les échantillons positifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par le Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur tous les échantillons positifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) était de 90,79 % (138/152) avec un CI à 95 % de 85,03 % à 94,87 %. Le pourcentage de concordance négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les échantillons négatifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par le Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur tous les échantillons négatifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) était de 100 % (135/135) avec un CI à 95 % de 97,30 % à 100 % (voir le Tableau 11).

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)		
		Négatif	Positif	Totaux
Bond Oracle HER2 IHC System	Négatif	135	14	149
	Positif	0	138	138
	Totaux	135	152	287

Concordance générale (CI à 95 %) = 95,12 % (91,95 % à 97,31 %)

Tableau 11. Concordance 2x2 du système de coloration Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur un tissu gastrique.

Résultats de la concordance 3x3

La concordance observée entre les deux tests dans une analyse 3x3 était de 89,90 % (258/287) avec un CI à 95 %, de 85,81 % à 93,13 %. L'hypothèse nulle (H_0) selon laquelle la concordance ne dépassait pas 75 % a donc été exclue avec une valeur $p < 0,0001$. Dans cette étude, le pourcentage de concordance positive pour 3+ ou l'aptitude du Bond Oracle HER2 IHC System à identifier correctement les échantillons positifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation positive 3+ à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par le Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur tous les échantillons positifs 3+ du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) était de 85,94 % (110/128) avec un CI à 95 % de 78,69 % à 91,45 %. Le pourcentage de concordance négative (spécificité) ou l'aptitude du test à identifier correctement les échantillons négatifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (le pourcentage d'échantillons ayant reçu une notation négative à la fois par le Bond Oracle HER2 IHC System et par le Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur tous les échantillons négatifs du Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) était de 100 % (135/135) avec un CI à 95 % de 97,30 % à 100 %. Voir le Tableau 12.

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)			
		Négatif (0 ou 1+)	2+	3+	Totaux
Bond Oracle HER2 IHC System	Négatif (0 ou 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	Totaux	135	24	128	287

Concordance générale (CI à 95 %) = 89,90 % (85,81 % à 93,13 %)

Tableau 12. Concordance 3x3 du système de coloration Bond Oracle HER2 IHC System avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) sur un tissu gastrique.

Immunoréactivité – panel normal

Type de tissu normal	Schéma de coloration	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Surrénale	Négatif	Négatif
Encéphale, cervelet	Négatif	Négatif
Encéphale, cerveau	Négatif	Négatif
Sein	Négatif	Négatif
Moelle osseuse	Négatif	Négatif
Côlon	Négatif	Négatif
Œsophage	Négatif	Négatif
Œil	Négatif	Négatif
Hypophyse	Coloration cytoplasmique modérée observée dans les cellules hypophysaires (1/3)	Négatif
Rein	Négatif	Négatif
Larynx	Négatif	Négatif
Foie	Négatif	Négatif
Poumon	Négatif	Négatif
Mésothélium	Négatif	Négatif
Ovaire	Négatif	Négatif
Pancréas	Négatif	Négatif
Parathyroïde	Négatif	Négatif
Nerf périphérique	Négatif	Négatif
Prostate	Négatif	Négatif
Glande salivaire	Négatif	Négatif
Peau	Négatif	Négatif
Intestin grêle	Négatif	Négatif
Rate	Négatif	Négatif
Estomac	Coloration cytoplasmique faible observée dans les glandes gastriques (2/3)	Négatif
Muscle strié	Négatif	Négatif
Testicule	Négatif	Négatif
Thymus	Négatif	Négatif
Thyroïde	Négatif	Négatif
Tonsille	Négatif	Négatif
Col de l'utérus	Négatif	Négatif
Utérus	Négatif	Négatif

Tableau 13. Coloration d'un panel normal

Étude de reproductibilité

Tests de précision au sein des processus et entre les processus

Le test de précision a été réalisé par Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Le tissu utilisé était une biopuce tissulaire (TMA) composite fixée au formol et enrobée de paraffine, fournie par Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), constituée de 20 échantillons tissulaires de cancer du sein invasif de 4 mm de diamètre. Les 20 cas ont été sélectionnés en fonction des notations HER2 attribuées au préalable. Sur cette base, x5 cas de HER2 3+, x5 cas de HER2 2+, x5 cas de HER2 1+ et x5 cas de HER2 0, ont été inclus.

A. Test de précision au sein des processus

Le test de précision au sein des processus des Bond Oracle HER2 IHC System a été évalué à partir d'un total de 40 coupes de TMA consécutives comprenant 20 tumeurs cancéreuses invasives et 40 HER2 Control Slides. Toutes les lames ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé BOND. Les coupes ont été colorées sur une période continue via un Bond Oracle HER2 IHC System du même lot de fabrication. Les coupes colorées ont fait l'objet d'une évaluation à l'insu réalisée de manière aléatoire par un seul observateur expérimenté pour déterminer la précision au sein des processus.

Une évaluation des lames à partir d'un examen réalisé au sein des processus a indiqué que les points de données 733/800 (91,63 %) du test pouvaient être interprétés. 40 points de données ont été exclus en raison de la présence de DCIS uniquement et 27 autres points de données n'ont pas pu être interprétés data en raison d'une perte de la tumeur invasive (spécifique à 3 échantillons). Une variation de la coloration s'est produite 61 fois (8,32 %) sur 733 événements de coloration possibles. Dans 37 cas, une variation de 3+ à 2+ (n = 20) et de 1+ à 0 (n = 17) a été observée et ne représenterait donc pas de changement du cliniquement positif vers le cas cliniquement négatif ou vice versa dans une évaluation des données 2x2. Les 24 (3,27 %) événements restants ont fait apparaître un changement du cliniquement négatif (0 ou 1+) vers le cliniquement positif (2+ ou 3+). Valeur transmise = 96,7 % (CI à 95 % = 95,15 % à 97,81%).

B. Test de précision entre les processus

Le test de précision entre les processus du Bond Oracle HER2 IHC System a été évalué à partir d'un total de 24 coupes de TMA consécutives comprenant 20 tumeurs cancéreuses invasives et 24 HER2 Control Slides. Toutes les lames ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé BOND. Les lames ont été évaluées dans le cadre de 8 processus indépendants qui se sont déroulés dans le même laboratoire, à trois occasions différentes avec un Bond Oracle HER2 IHC System du même lot de fabrication. Les lames colorées ont fait l'objet d'une évaluation à l'insu réalisée de manière aléatoire par un seul observateur expérimenté pour déterminer la précision entre les processus.

Une évaluation des lames dans le cadre d'un examen entre les processus a indiqué que les points de données 456/480 (95,00 %) du test pouvaient être interprétés. 24 points de données n'ont pas pu être interprétés en raison de la perte d'une tumeur invasive (spécifique à 5 échantillons). Une variation de la coloration s'est produite 42 fois (9,21 %) sur 456 points de données. Dans 30 cas, une variation de 3+ à 2+ (n = 10) et de 1+ à 0 (n = 20) a été observée et ne représenterait donc pas de changement du cliniquement positif vers le cas cliniquement négatif ou vice versa dans une évaluation des données 2x2. Les 12 cas (2,63 %) restants ont fait apparaître un changement du cliniquement négatif (0 ou 1+) vers le cliniquement positif (2+ ou 3+). Valeur transmise = 97,37 % (CI à 95 % = 95,90 % à 98,77%).

C. Reproductibilité lot à lot

Afin de déterminer la reproductibilité lot à lot, 3 lots des Bond Oracle HER2 IHC System ont été fabriqués en 3 occasions différentes selon des règles de bonnes pratiques de fabrication et évalués sur 24 coupes de tumeur du sein (24 points de données de test) prélevées sur quatre blocs tissulaires fixés au formol et enrobés de paraffine (représentant des intensités de coloration HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+) et trois HER2 Control Slides (12 points de données de contrôle). Trois processus indépendants ont été exécutés dans le même laboratoire en trois occasions différentes, utilisant à chaque fois un lot de fabrication séparé du Bond Oracle HER2 IHC System. Toutes les lames ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé BOND. Les lames colorées ont fait l'objet d'une évaluation à l'insu réalisée de manière aléatoire par un seul observateur formé pour déterminer la reproductibilité lot à lot.

Une évaluation des lames (tests et contrôles) dans le cadre de l'examen de lot à lot a indiqué que les points de données 36/36 pouvaient être interprétés. Aucune variation de la coloration ne s'est produite dans les 36 points de données entre les trois lots de fabrication différents du Bond Oracle HER2 IHC System. La coloration réalisée avec le Bond Oracle HER2 IHC System est homogène entre les lots de fabrication.

D. Reproductibilité inter-laboratoire

Le test de reproductibilité inter-laboratoire du Bond Oracle HER2 IHC System a été réalisé sur 3 sites, Leica Biosystems Newcastle (Site A), et deux laboratoires indépendants (Sites B et C) intégrant un total de 192 coupes de TMA comprenant 20 tumeurs cancéreuses invasives et 24 HER2 Control Slides. Parmi les 192 coupes de TMA colorées, 96 ont été colorées par le HER2 Primary Antibody et 96 par le réactif HER2 Negative Control. Toutes les lames ont été colorées avec le Bond Oracle HER2 IHC System intégré au système de coloration avancé entièrement automatisé BOND. Les lames ont été évaluées dans le cadre de 8 processus indépendants qui se sont déroulés sur 3 sites d'examen différents via un Bond Oracle HER2 IHC System du même lot de fabrication. Les lames colorées ont fait l'objet d'une évaluation à l'insu réalisée de manière aléatoire par un seul observateur expérimenté dans le laboratoire Leica Biosystems, Newcastle pour déterminer la reproductibilité inter-laboratoire.

Une évaluation des lames dans le cadre d'un examen de reproductibilité inter-laboratoire a indiqué que les points de données du test 1477/1920 (76,93 %) pouvaient être interprétés. 443 points de données du test n'ont pas pu être interprétés en raison de :

- a) la performance inadéquate de la HER2 Control slide dans 2/24 cas impliquant le retrait de 2 processus/160 points de données de test. Cet événement s'est produit une fois sur le Site A et une fois sur le Site B (80 points de données de test ont été retirés par site).
- b) Écart entre le plan de test du Site C, dans lequel 24 lames au total ont subi une coloration de contraste manuelle à l'hématoxyline selon la coloration Bond Oracle HER2 IHC System. Ceci a entraîné une coloration de contraste excessive des lames de contrôle HER2 et des points de données TMA, impliquant le retrait de 240 points de données.
- c) Perte de tumeur invasive impliquant le retrait de 23 points de données de test. Cet événement s'est produit à 23 occasions sur le Site A, résultant directement de la perte de tissu dans le bloc TMA lors de la production des 192 coupes de TMA consécutives requises pour l'exécution de l'examen.
- d) Impossibilité d'interpréter la coloration en raison d'un lavage inadéquat par le système de coloration avancé entièrement automatisé BOND, impliquant le retrait de 20 points de données.

Une évaluation des lames pouvant être interprétées dans le cadre de l'examen de précision inter-laboratoires a indiqué qu'une variation de coloration s'était produite dans 79 cas (5,28%) sur 1477 événements de coloration possibles. Parmi ceux-ci, 14/1477 (0,95 %) cas ont fait apparaître des variations de 0 à 1+ ou 2+ à 3+ et ne représentent pas, en tant que tels, un changement du cliniquement positif au cliniquement négatif ou vice versa dans une évaluation des données 2x2. Valeur transmise = 99,05 % (CI à 95 % = de 98,42 % à

99,46 %). Parmi les 14 événements de coloration, 5/1477 (0,34 %) se sont produits sur le site de Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Site A), 8/1477 (0,54 %) sur le Site B et 1/1477 (0,07 %) sur le Site C.

Les 65/1477 (4,40 %) événements de coloration restants ont fait apparaître une variation de 2+ à 1+ ou de 2+ à 0 et représenteraient ainsi un changement du cliniquement positif au cliniquement négatif ou vice versa dans une évaluation des données 2x2. Valeur transmise = 95,6 % (CI à 95 % = de 94,42 % à 96,54 %). Parmi les 65 changements cliniquement importants, 11/65 (16,9 %) se sont produits sur le site de Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Site A), 24/65 (36,9 %) sur le Site B et 30/65 (46,1 %) sur le Site C. Parmi les changements cliniquement importants, il n'y a eu aucun changement 3+ vers un résultat négatif (0 ou 1+) ou vice versa.

E. Reproductibilité inter-observateurs

40 cas de cancer du sein invasif sélectionnés de manière aléatoire, fournissant une distribution égale de chaque degré HER2 IHC (résection des échantillons) ont été coupés consécutivement et fournis à Leica Biosystems, Newcastle (Site A), Site B et Site C pour la coloration et l'interprétation. Les coupes étaient masquées et réparties au hasard sur chaque site avant la notation. La concordance inter-observateurs entre les sites cliniques indépendants, Site B et Site C, était de 87,5 % (CI à 95 % = 73,3 % à 95,8 %). La concordance entre le Site B et le Site C et Leica Biosystems Newcastle, Ltd était respectivement de 92,5 % (CI à 95 % = 79,6 % à 98,4 %) et de 85 % (CI à 95 % = 70,1 % à 94,29 %). Le résultat de l'analyse de la concordance totale entre les trois observateurs (A, B, C) est de 82,50 %.

F. Précision inter-instruments (BOND-MAX v BOND-III)

Le test de précision inter-instruments utilisant le Bond Oracle HER2 IHC System a été réalisé sur un seul site d'examen européen indépendant. Les échantillons testés ont été obtenus à partir de coupes fixées au formol et enrobées de paraffine provenant de cent trente-huit (138) cas de cancer du sein invasif (microbiopsie au trocart et résection des échantillons). Le test inter-instruments a été réalisé prospectivement sur le site d'examen, les coupes de coloration consécutives sur les plate-formes BOND-MAX et BOND-III. Trois (3) cas ont été considérés comme inappropriés en raison de la disponibilité de l'échantillon/de la tumeur, ce qui implique leur retrait de l'étude.

Des numéros de lot identiques des réactifs auxiliaires du Bond Oracle HER2 IHC System et de l'instrument BOND ont été utilisés pour chaque instrument. Les coupes étaient colorées rétrospectivement. Les lames ont été interprétées sur le site de l'examen par un seul observateur expérimenté afin de déterminer la précision inter-instruments.

Une évaluation des lames réalisée dans le cadre de la précision inter-instruments a fait apparaître une concordance 2x2 de 94,2 % (130/138) avec un CI à 95 %, de 88,9 à 97,5 % entre les cas positifs (2+, 3+) et négatifs (0, 1+) et une concordance 3x3 de 87,0 % (120/138) avec un CI à 95 %, 80,2 à 92,1 % entre les cas positifs (3+), équivoques (2+) et négatifs (0, 1+).

		BOND-MAX		
		Négatif (0/1+)	Positif (2/3+)	Totaux
BOND-III	Négatif (0/1+)	80	1	81
	Positif (2/3+)	7	50	57
	Totaux	87	51	138

Concordance générale (CI à 95%) = 94,2 % (88,9 à 97,5 %)

Tableau 14. Concordance 2x2 du système de coloration Bond Oracle HER2 IHC System sur BOND-MAX par rapport aux plate-formes BOND-III.

		BOND-MAX			
		Négatif (0/1+)	Équivoque (2+)	Positif (2/3+)	Totaux
BOND-III	Négatif (0/1+)	80	1	0	81
	Équivoque (2+)	6	5	1	12
	Positif (3+)	1	9	35	45
	Totaux	87	15	36	138

Concordance générale (CI à 95%) = 87,0 % (80,2 à 92,1 %)

Tableau 15. Concordance 3x3 du système de coloration Bond Oracle HER2 IHC System sur BOND-MAX par rapport aux plate-formes BOND-III.

En conclusion, les données obtenues dans cette étude démontrent un niveau de concordance élevé entre les systèmes Leica Biosystems' BOND-MAX et BOND-III lorsque le système Bond Oracle HER2 IHC System est utilisé pour l'évaluation.

Dépannage

Problème	Cause probable	Correction
Pas de coloration immunohistochimique	Processus interrompu avant la fin	À l'aide du logiciel BOND, confirmer la présence de toute erreur pouvant être rapportée pendant le processus de coloration et suivre les instructions du logiciel BOND.
	Sélection du protocole incorrect	Vérifier que les paramètres appropriés sont appliqués à *IHC Protocol H dans le champ du protocole de coloration de la boîte de dialogue Add slide.
	Déparaffinisation inadéquate des lames	Vérifier que le mode *Dewax est sélectionné dans le champ Préparation de la boîte de dialogue Add slide.
	Distribution de réactifs en vrac inappropriés	Vérifier que tous les réactifs BOND ont été attribués aux conteneurs de vrac appropriés et qu'ils ont été correctement positionnés sur l'instrument.
	Contamination de la BOND Wash Solution à l'acide de sodium	Utiliser une BOND Wash Solution fraîchement préparée présentant une force d'action appropriée.
Coloration immunohistochimique spécifique faible	Récupération d'épitope inappropriée	Vérifier que les réactifs BOND Epitope Retrieval appropriés ont été affectés aux conteneurs de vrac corrects, et que le logiciel BOND a appliqué *HIER 25 min with *ER1 (97) au protocole de récupération d'épitope approprié.
	Fixation ou traitement inappropriés d'échantillons test	Vérifier qu'un fixatif à base de formol est utilisé et que les calendriers de processus conviennent au test de l'échantillon en cours.
	Le Bond Oracle HER2 IHC System est utilisé alors que sa date de péremption a expiré	Vérifier que la date de péremption du Bond Oracle HER2 IHC System utilisé n'a pas expiré.

Problème	Cause probable	Correction
Coloration immunohistochimique spécifique excessive	Récupération d'épitope inappropriée	Vérifier que les réactifs BOND Epitope Retrieval ont été affectés aux conteneurs de vrac corrects, et que le logiciel BOND a appliqué *HIER 25 min with ER1 (97) .
	Variation de la fixation	Vérifier qu'un fixatif à base de formol est utilisé et que les calendriers de processus conviennent au test de l'échantillon en cours. Si possible, retester le cas en utilisant un autre bloc tissulaire. Si cela n'est pas possible, évaluer les zones faisant apparaître les meilleurs schémas de fixation en association avec la coupe colorée H&E.
Coloration de fond non spécifique	Distribution de réactifs en vrac inappropriés	Vérifier que tous les réactifs BOND ont été attribués aux conteneurs de vrac appropriés et qu'ils ont été correctement positionnés sur l'instrument.
	Déparaffinisation inadéquate des lames	Vérifier que *Dewax est sélectionné dans le champ Préparation de la boîte de dialogue Add slide.
	Réaction croisée immunohistochimique non spécifique dans le tissu	Consulter la description de la réactivité croisée des tissus normaux du Bond Oracle HER2 IHC System (voir Tableau 13).
	Réaction croisée immunohistochimique avec des zones de nécrose tissulaire	Vérifier qu'un fixatif à base de formol est utilisé et que les calendriers de processus conviennent au test de l'échantillon en cours. Si possible, retester le cas en utilisant un autre bloc tissulaire. Si cela n'est pas possible, évaluer les zones faisant apparaître les meilleurs schémas de fixation en association avec la coupe colorée H&E correspondante.
	Artéfact de chauffage en fonction de l'exécution du processus de coloration	Si les lames doivent être positionnées en vue d'un processus de nuit, il est recommandé d'utiliser la fonction de mise en marche différée du BOND. Vérifier l'adéquation du volume d'eau distillée ou déionisée disponible devant être réparti sur les lames pendant cette période afin d'éviter tout séchage des lames.
	Coupes entièrement collées aux lames en raison d'additifs à base d'amidon	Utiliser des lames non amidonnées (Leica BOND Plus Slides, réf. S21.2113 ou Apex BOND Slides réf. 3800040).
Tissu détaché de la lame du patient/de contrôle	Utilisation d'un type de lames incorrect ou d'un drainage inadéquat de la coupe	Vérifier que les lames appropriées sont utilisées pour les coupes du patient/de contrôle (Leica BOND Plus Slides, réf. S21.2113 ou Apex BOND Slides réf. 3800040). Vérifier le drainage correct des lames et leur incubation pendant 12 à 18 heures à 37 °C (pendant la nuit). Les coupes qui requièrent davantage d'adhérence peuvent être incubées à 60 °C pendant une heure supplémentaire.

Tableau 16. Guide de dépannage du Bond Oracle HER2 IHC System.

S'il apparaît un problème lié au Bond Oracle HER2 IHC System qui ne serait pas traité dans le présent guide de dépannage (voir Tableau 16), veuillez contacter votre distributeur ou le service technique local de Leica Biosystems'.

Références

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; 52:797-805
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: Immunohistochemistry 2007 (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
23. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology 1980; 73: 626-32.
24. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. Journal of Clinical Pathology 2006.











Modifications apportées à l'édition précédente

Composants fournis, Identification des symboles.

Date de publication

16 juillet 2020

Identification des symboles

	Code séquentiel		Stockage		Numéro du catalogue
	Dispositif médical de diagnostic in vitro		Fabricant		Fragile
	eFU - consulter le mode d'emploi		Contenance suffisante pour <n> tests		À utiliser avant AAAA-MM-JJ
N° S.	Numéro de série		Prescription seulement		

HercepTest™ est une marque commerciale de DakoCytomation dont l'utilisation est soumise à licence, Denmark A/S Herceptin® est une marque commerciale de Genentech, Inc. et F. Hoffmann-La Roche Ltd.