

# Gebruiksaanwijzingen voor het Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

Voor gebruik in het volledig geautomatiseerde en geavanceerde BOND™-kleuringssysteem van Leica Biosystems.

Productcode TA9145 is speciaal ontwikkeld voor het kleuren van 60 tests (150 objectglaasjes):

60 test-objectglaasjes met HER2 Primary Antibody

60 test-objectglaasjes met HER2 Negative Control

15 HER2-controleglaasjes met HER2 Primary Antibody

15 positieve bedrijfseigen controleweefsels met HER2 Primary Antibody



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



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

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

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

# Inhoudsopgave

<b>Beoogd gebruik</b> .....	<b>4</b>
<b>Samenvatting en uitleg</b> .....	<b>4</b>
Achtergrond .....	4
Expressie van HER2 .....	5
Samenvatting van klinische concordantie .....	5
<b>Beginsel van de procedure</b> .....	<b>5</b>
Meegeleverde componenten .....	5
Gebruiksaanwijzing .....	6
Opslag en stabiliteit .....	6
Vorbereiding van monsters .....	6
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....	7
<b>Procedure</b> .....	<b>7</b>
A. Vereiste maar niet meegeleverde reagentia .....	7
B. Vereiste maar niet meegeleverde apparatuur .....	7
C. Methodiek .....	8
D. Indeling van objectglaasjes .....	8
E. Procedurele stappen .....	9
<b>Kwaliteitscontrole</b> .....	<b>11</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	11
Bedrijfseigen positief controleweefsel – HER2 Primary Antibody .....	12
Component van bedrijfseigen negatief controleweefsel – HER2 Primary Antibody .....	12
Patiëntweefsel – HER2 Negative Control .....	12
Patiëntweefsel – HER2 Primary Antibody .....	12
Verificatie van de analyse .....	12
Interpretatie van kleuring - borst .....	13
Interpretatie van kleuring - maag .....	14
<b>Verklaring van controlevolgorde voor objectglaasjes</b> .....	<b>15</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	15
2. Bedrijfseigen positief controleweefsel – HER2 Primary Antibody .....	15
3. Component van bedrijfseigen negatief controleweefsel – HER2 Positive Control .....	15
4. Patiëntweefsel – gekleurd met behulp van de HER2 Negative Control .....	15
5. Patiëntweefsel – gekleurd met behulp van de HER2 Primary Antibody .....	15
<b>Beperkingen</b> .....	<b>15</b>
A. Algemene beperkingen .....	15
B. Productspecifieke beperkingen .....	16
<b>Cellijngegevens</b> .....	<b>17</b>
<b>Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met Dako HercepTest - Borst</b> .....	<b>17</b>
2x2 concordantieresultaten .....	18
3x3 concordantieresultaten .....	19
<b>Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Borst</b> .....	<b>19</b>
3x2 concordantieresultaten .....	20
<b>Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Maag</b> .....	<b>21</b>
<b>Resultaten - Bond Oracle HER2 IHC System vs. Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Maag</b> .....	<b>21</b>
2x2 concordantieresultaten .....	21
3x3 concordantieresultaten .....	22
<b>Immunoreactiviteit – normaal panel</b> .....	<b>23</b>

<b>Reproduceerbaarheidsonderzoek .....</b>	<b>24</b>
Precisietests binnen en tussen runs .....	24
A. Precisietests tijdens runs .....	24
B. Precisietests tussen runs .....	24
C. Reproduceerbaarheid van partij tot partij .....	25
D. Reproduceerbaarheid tussen laboratoria .....	25
E. Reproduceerbaarheid tussen observatoren .....	26
F. Precisie tussen instrumenten (BOND-MAX versus BOND-III) .....	26
<b>Probleemoplossing .....</b>	<b>28</b>
<b>Referenties .....</b>	<b>30</b>

## Beoogd gebruik

### Voor diagnostisch gebruik in vitro

Het Bond Oracle HER2 IHC System is een semikwantitatieve immunohistochemische (IHC)-analyse die ten doel heeft de status te bepalen van het oncoproteïne HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) in borstkankerweefsel en adenocystische carcinomen van de maag (inclusief gastro-oesofageale overgang) die zijn verwerkt voor een histologische evaluatie. Het Bond Oracle HER2 IHC System wordt aangemerkt als een hulpmiddel voor de evaluatie van patiënten voor wie een behandeling met Herceptin® (trastuzumab) wordt overwogen (zie de bijsluiters van de Herceptin®-verpakking).

N.B.: Alle patiënten die deelnamen aan de klinische trials voor Herceptin® werden geselecteerd op basis van een klinische trialanalyse (CTA). Geen van de patiënten die aan deze trials deelnamen werden geselecteerd met behulp van het Bond Oracle HER2 IHC System. Het Bond Oracle HER2 IHC System werd vergeleken met de Dako HercepTest™ op basis van een onafhankelijke reeks van monsters. Er werd geconstateerd dat het systeem resultaten bood met een acceptabele concordantie, zoals aangegeven in de samenvatting van de klinische concordantie. De werkelijke correlatie tussen het Bond Oracle HER2 IHC System en de klinische resultaten is niet vastgesteld.

Alle patiënten die deelnamen aan de klinische trials voor Herceptin® voor gevorderde maagkanker (ToGA) waren geselecteerd met behulp van de Dako HercepTest. Geen van de patiënten die aan deze trials deelnamen werden geselecteerd met behulp van het Bond Oracle HER2 IHC System. Het Bond Oracle HER2 IHC System is vergeleken met het Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody op een onafhankelijke reeks monsters. De concordantie van de resultaten werd acceptabel bevonden, zoals aangegeven in de klinische concordantiesamenvatting (maag). De werkelijke correlatie tussen het Bond Oracle HER2 IHC System en de klinische resultaten is niet vastgesteld.

## Samenvatting en uitleg

### Achtergrond

Het Bond Oracle HER2 IHC System bevat het monoklonale muis-antilichaam tegen HER2, kloon CB11. Kloon CB11 werd oorspronkelijk ontwikkeld door Corbett et al (1) en gefabriceerd door Novocastra Laboratories Ltd (inmiddels Leica Biosystems Newcastle Ltd). Het antilichaam richt zich tegen het interne domein van het oncoproteïne HER2.

In een deel van borst- en maagkanker patiënten HER2 oncoproteïne overexpressie wordt gebracht als onderdeel van het proces van kwaadaardige transformatie en tumorprogressie (2). HER2-status bleek ook belangrijke implicaties voor de behandeling van maagkanker (3) hebben. Overexpressie van het HER2 oncoproteïne in borstkankercellen suggereert HER2 als een doelwit voor antilichaam-gebaseerde therapie, terwijl de resultaten van de proef ToGA duidelijk aan dat het gebruik van Herceptin® in maagkanker met chemotherapie is een effectieve behandeling die overleving verbetert bij HER2 positieve maagkanker (4). HERCEPTIN® is een gehumaniseerd monoklonaal antilichaam (5) dat bindt met hoge affiniteit aan de HER2 oncoproteïne en is aangetoond dat de proliferatie van humane tumorcellen die HER2 tot overexpressie brengen remmen oncoproteïne zowel in vitro als in vivo (6-8).

Sinds de eerste immunoperoxidasetechniek, gerapporteerd door Nakane en Pierce (9), hebben er vele ontwikkelingen op het gebied van immunohistochemie plaatsgevonden en tot een verhoogde gevoeligheid geleid. Een recente ontwikkeling is het gebruik van polymeerlabeling. Deze technologie is toegepast op primaire antilichamen en immunohistochemische detectiesystemen (10). Het detectiesysteem Compact Polymer™ dat door het Bond Oracle HER2 IHC System wordt gebruikt vormt onderdeel van een reeks van nieuwe, technologieën voor gecontroleerde polymerisatie die specifiek zijn ontwikkeld voor het prepareren van polymerische HRP-gekoppelde antilichaamconjugaten. Aangezien deze polymeertechnologie binnen de Oracle-productreeks wordt toegepast, is er geen sprake van niet-specifieke kleuring met endogene biotine, iets wat voorkomt bij detectiesystemen op basis van streptavidine/biotine.

## Expressie van HER2

Het oncoproteïne HER2 vindt haar expressie op niveaus die immunochemisch detecteerbaar zijn in tot 20% van de adenocystische carcinomen uit verschillende locaties. Between 10% and 20% of invasive ductal carcinomas of the breast (11) and 20% of gastric cancers (12-14) are positive for HER2 oncoprotein. 90% van alle gevallen van ductal carcinoma in situ (DCIS) van het type comedo zijn positief (15), samen met bijna alle gevallen van de ziekte van Paget van de borst (16).

## Samenvatting van klinische concordantie

Het Bond Oracle HER2 IHC System is ontwikkeld als alternatief voor de klinische trial (CTA) die werd gebruikt voor klinisch onderzoek naar Herceptin®. De prestatie van het Bond Oracle HER2 IHC System bij het vaststellen van de status van het oncoproteïne HER2 werd geëvalueerd in een onafhankelijk onderzoek dat de resultaten van het Bond Oracle HER2 IHC System vergeleek met die van de Dako HercepTest voor 431 monsters van borsttumoren van Amerikaanse herkomst. Geen van deze tumormonsters werd verkregen van patiënten die hadden deelgenomen aan de klinische trials voor Herceptin®. De resultaten wezen op een concordantie van 92,34% in een 2x2-analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 89,42% tot 94,67%) en 86,54% in een 3x3-analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 82,95% tot 89,62%) tussen de resultaten van de twee proeven.

De prestatie van het Bond Oracle HER2 IHC System voor het bepalen van de overexpressie van het oncoproteïne HER2 op adenocystische carcinomen van de maag (inclusief gastro-oesofageale overgang) werd geëvalueerd op basis van een onafhankelijk onderzoek waarvoor de resultaten van het Bond Oracle HER2 IHC System werden vergeleken met die van het Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody voor 287 monsters van maagtumoren van Chinese oorsprong. Geen van deze tumormonsters werd verkregen van patiënten die hadden deelgenomen aan de klinische trials voor Herceptin®. De resultaten wezen op een concordantie van 95,12% in een 2x2-analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 91,95% tot 97,31%) en 89,90% in een 3x3-analyse (95% betrouwbaarheidsintervallen van 85,81% tot 93,13%) tussen de resultaten van het Bond Oracle HER2 IHC System resp. het Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5).

## Beginsel van de procedure

Het Bond Oracle HER2 IHC System bevat componenten die benodigd zijn om een immunohistochemische kleuringsprocedure uit te voeren voor weefsels die in formaline zijn gefixeerd en in paraffine zijn ingebed. Na incubatie met het kant-en-klare HER2 Primary Antibody (kloon CB11) maakt dit systeem gebruik van kant-en-klare Compact Polymer-technologie. De enzymconversie van de daarop toegevoegde chromogeen resulteert in de vorming van een zichtbaar reactieproduct op de antigene plaats. De weefselcoupes kunnen vervolgens worden tegengekleurd, gedroogd, schoongemaakt en gemonteerd. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van optische microscopie. Controleglaasjes met vier in formaline gefixeerde en in paraffine ingebede menselijke borstkanker-cellijnen worden beschikbaar gesteld voor het valideren van de kleuringsruns. De vier cellijnen tonen een expressie van het oncoproteïne HER2 met een intensiteit van 0, 1+, 2+ en 3+. De kleuringsintensiteit van deze cellijnen houdt verband met het aantal receptoren van het oncoproteïne HER2 per cel en met de HER2-genamplificatiestatus.

Het Bond Oracle HER2 IHC System (productcode TA9145) is bestemd voor gebruik binnen het volledig geautomatiseerde, geavanceerde kleuringsstelsel BOND van Leica Biosystems.

## Meegedeleverde componenten

De hieronder vermelde materialen (tabel 1) zijn voldoende voor het kleuren van 150 objectglaasjes (60 test-objectglaasjes geïncubeerd met HER2 Primary Antibody, 60 overeenkomstige testobjectglaasjes geïncubeerd met HER2 Negative Control, 15 controleglaasjes met HER2 geïncubeerd met HER2 Primary Antibody en 15 bedrijfsgeïncubeerde positieve controleweefsels geïncubeerd met HER2 Primary Antibody). Het aantal tests is gebaseerd op een automatische afgifte van 150 µL per objectglaasje. De set biedt voldoende materiaal voor maximaal 15 afzonderlijke kleuringsruns met behulp van het BOND-systeem.

<b>HER2 Control Slides (x15)</b>	Coupees van in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde menselijke borstkanker-cellijnen die een expressie van het oncoproteïne HER2 tonen met een kleuringsintensiteitsniveau van 0, 1+, 2+ en 3+, indien gekleurd volgens het gespecificeerde protocol. Deze coupes zijn volledig gehecht en vereisten geen verdere aanhechting.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 mL</b>	Bevat kant-en-klaar affiniteitgezuiverd monokonaal IgG-muisantilichaam kloon CB11 een 0,35% ProClin™ 950.
<b>HER2 Negative Control, 9 mL</b>	Bevat kant-en-klaar muis-IgG met een concentratie die overeenkomt met de HER2 Primary Antibody en 0,35% ProClin™ 950.
<b>Peroxide Block, 22,5 mL</b>	Bevat 3-4% waterstofperoxide.
<b>Post Primary, 22,5 mL</b>	Konijn anti-muis IgG (<10 µg/mL) in Tris-gebufferde saline met 10% (v/v) dierlijk serum en 0,09% ProClin™ 950.
<b>Polymer, 22,5 mL</b>	Poly-HRP geit anti-konijn IgG (<25 µg/mL) in met Tris gebufferde saline bevattende 10% (v/v) dierlijk serum en 0,09% ProClin™ 950.
<b>DAB Part 1, 2.25 mL</b>	Bevat 66 mM 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride in een stabiliserende oplossing.
<b>DAB Part B (x2), 2,5 mL</b>	Bevat ≤0,1% (v/v) waterstofperoxide.
<b>Hematoxylin, 22,5 mL</b>	Bevat <0,1% hematoxyline.

Tabel 1. Componenten van het Bond Oracle HER2 IHC System

## Gebruiksaanwijzing

Alle aangeleverde reagentia zijn specifiek geformuleerd voor gebruik met deze analyse. De partijnummers zijn specifiek voor elk Bond Oracle HER2 IHC System. Om de geldigheid van de analyse te waarborgen mogen er geen vervangingen plaatsvinden.

## Opslag en stabiliteit

Sla het systeem op bij een temperatuur van 2 tot 8 °C. Vries het niet in. Laat het systeem direct na gebruik terugkeren naar een temperatuur van 2–8 °C. Elke afwijking van deze voorwaarden zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt. Gebruik het Bond Oracle HER2 IHC System tot de uiterste houdbaarheidsdatum. Tekenen die wijzen op contaminatie en/of instabiliteit van het Bond Oracle HER2 IHC System zijn: vertroebeling van de oplossingen, het ontstaan van geuren en de aanwezigheid van neerslag. Andere opslagcondities dan de hierboven gespecificeerde condities moeten door de gebruiker worden geverifieerd.

## Vorbereiding van monsters

Alle monsters moeten worden voorbereid om het weefsel te beschermen tegen immunohistochemische kleuring. Voor alle monsters (17) dient gebruik te worden gemaakt van standaardmethoden voor het verwerken van weefsel.

Het wordt aanbevolen om weefsels te prepareren in formalinegebaseerde fixeerstoffen en volgens de standaardroutine te verwerken en in paraffine in te bedden. Zo moeten resectie monsters worden geblokkeerd in een dikte van 3 tot 4 mm en gedurende een periode van 18 tot 24 uur worden gefixeerd in 10% neutraal gebufferde formaline. De weefsels moeten vervolgens worden gedroogd in een reeks van alcoholen en gezuiverd met xyleen, gevolgd door impregnering met gesmolten paraffinewas die op een temperatuur onder de 60 °C wordt bewaard. Weefselmonsters moeten tussen de 3 en 5 µm worden gecoupeerd.

De objectglaasjes die zijn vereist voor het evalueren van het oncoproteïne HER2 en de verificatie van tumoren moeten tegelijkertijd worden geprepareerd. Om de antigene potentie te behouden, moeten weefselcoupes die op objectglaasjes zijn aangebracht (Leica BOND Plus Slides – productcode S21.2113) binnen 4 tot 6 weken na coupure worden gekleurd indien bewaard op kamertemperatuur

(18–24 °C). Na het couperen wordt het aanbevolen om objectglaasjes gedurende een periode van 12-18 uur (een nacht lang) te incuberen op een temperatuur van 37 °C. Coupes die extra adhesie vereisen kunnen een uur langer worden geïncubeerd op 60 °C.

In de Verenigde Staten schrijft de Clinical Laboratory Improvement Act van 1988 in 42 CFR 493.1259(b) het volgende voor: "Het laboratorium dient gekleurde objectglaasjes minimaal tien jaar vanaf de onderzoeksdatum te bewaren en dient monsterblokken tot minimaal twee jaar na de onderzoeksdatum te bewaren".

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

*Alleen bestemd voor professionele gebruikers.*

Een of meer onderdelen van het product zijn gevaarlijk.

Personen onder de 18 jaar hebben geen toestemming om dit product te gebruiken. Gebruikers moeten grondig te worden geïnstrueerd met betrekking tot de juiste werkprocedure, de gevaarlijke kenmerken van het product en de benodigde veiligheidsmaatregelen.

Symptomen van overmatige blootstelling aan ProClin™ 950, het conserveringsmiddel dat wordt gebruikt in de Oracle-reagentia, zijn onder meer irritatie van de huid, de ogen, het slijmvlies en het bovenste deel van de luchtwegen. De concentratie van ProClin™ 950 in dit product bedraagt maximaal 0,35%. Deze oplossingen voldoen niet aan de OSHA-criteria voor gevaarlijke stoffen. Een veiligheidsinformatieblad is op aanvraag verkrijgbaar en daarnaast beschikbaar op [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

Monsters moeten voor en na fixatie, evenals alle materialen die eraan zijn blootgesteld, worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en op basis van passende voorzorgsmaatregelen worden afgedankt.

Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Daarnaast moet contact tussen de huid en het slijmvlies en reagentia en monsters worden vermeden. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts. Raadpleeg de federale, staats- of lokale richtlijnen voor het afdanken van potentieel giftige componenten. Minimaliseer de kans van een microbacteriële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.

## Procedure

### A. Vereiste maar niet meegeleverde reagentia

- BOND Dewax Solution (productcode AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (productcode AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (productcode AR9590)
- Standaardoplossingen die voor immunohistochemie worden gebruikt (zoals ethanol, puur en in verdunding)
- Xyleen (of xyleensubstituten)
- Montagemedium
- Gedistilleerd of gedesoniseerd water

### B. Vereiste maar niet meegeleverde apparatuur

- Volledig geautomatiseerde, geavanceerde BOND-MAX en BOND-III-kleuringssystemen van Leica Biosystems
- BOND Universal Covertiles™ (productcode S21.2001, S21.4583 of S21.4611)
- BOND Mixing Stations (productcode S21.1971)
- Droogoven die in staat is om een temperatuur van 60 °C in stand te houden
- Lichtmicroscop (4–40x objectiefvergroting)
- Objectglaasjes (Leica BOND Plus Slides – productcode S21.2113)
- Degglaasjes
- BOND Slide Label & Print Ribbon (productcode S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (productcode CS9100)

## C. Methodiek

- Voordat gebruikers deze methodiek hanteren, dienen zij training te ontvangen met betrekking tot de volledig geautomatiseerde immunohistochemische BOND-technieken.
- Voor elke testcoupe die met de HER2 Primary Antibody wordt gekleurd, is een identieke coupe vereist voor kleuring met de HER2 Negative Control. De coupe met negatief controleweefsel maakt het mogelijk om een onderscheid te maken tussen specifieke en niet-specifieke kleuring op de antigene plaats. Voor elke BOND-kleuringsrun moet een HER2 Control Slide worden gebruikt. Als de cellijnen aan het einde van het kleuringsprotocol niet de juiste kleuringspatronen tonen (zie de Bond Oracle HER2 IHC Systems Interpretation Guide), moet de run als ongeldig worden beschouwd.

## D. Indeling van objectglasjes

Voor elk objectglasje moet een nieuw BOND Universal Covertile (productcode S21.2001, S21.4583 of S21.4611)-dekglasje orden gebruikt. Het gebruik van BOND Universal Covertiles die eerder zijn gebruikt voor immunohistochemische of in situ hybridisatiekleuring is niet gevalideerd met deze test.

De indeling van de lade met objectglasjes (tabel 2) zorgt voor een optimale prestatie van het Bond Oracle HER2 IHC System en maakt het mogelijk om de volledige 60 tests te realiseren.

Positie van objectglasje	Beschrijving van objectglasje	Reagens	Weefseltype	Pictogram objectglasje
1	Weefselmonster 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Weefselmonster 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Weefselmonster 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Weefselmonster 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Weefselmonster 1	*HER2 Primary Antibody	Test	
6	Weefselmonster 2	*HER2 Primary Antibody	Test	
7	Weefselmonster 3	*HER2 Primary Antibody	Test	
8	Weefselmonster 4	*HER2 Primary Antibody	Test	
9	HER2 Control Slide	*HER2 Primary Antibody	Positief	
10	Bedrijfseigen controleweefsel	*HER2 Primary Antibody	Positief	

Tabel 2. Indeling van de lade met objectglasjes met weergave van het weefseltype en de reagens



## E. Procedurele stappen

Volg de onderstaande stappen om een lade met objectglasjes in te delen volgens tabel 2. Deze instructies moeten worden gelezen in samenhang met de BOND System User Manual.

1. Zorg ervoor dat de bulkcontainers en containers voor gevaarlijk afvalmateriaal van het BOND-instrument voldoende capaciteit hebben om de vereiste kleuringruns uit te voeren.
2. Zorg ervoor dat er voldoende alcohol, gedestilleerd of gedesioniseerd water, BOND Dewax Solution (kant-en-klaar geleverd), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (kant-en-klaar geleverd) en BOND Wash Solution (geleverd als x10 concentraat) in de bulkreagenscontainers aanwezig is om de vereiste kleuringruns uit te voeren.
3. Controleer of een schoon BOND Mixing Station is geïnstalleerd.
4. Schakel het volledig geautomatiseerde, geavanceerde BOND-kleuringssysteem in.
5. Schakel de BOND controleur in die op het volledig geautomatiseerde, geavanceerde BOND-kleuringssysteem is aangesloten.
6. Open de BOND-software.
7. In het geval van een nieuw Bond Oracle HER2 IHC System moet u de streepjescodes van de reagensladen scannen met de handheld scanner om het systeem in de BOND reagensvoorraad in te voeren.
8. Ga naar het venster Slide setup en klik op **Add case**.
9. Voer de gegevens voor het eerste weefselmonster in. Zorg ervoor dat het afgiftevolumen is ingesteld op **150 µL** en dat **\*Dewax** is ingesteld als preparatieprotocol. Klik op OK.
10. Klik nadat u in het venster Slide setup het weefselmonster heeft gemarkeerd op **Add slide**.
11. Voeg eerste test-objectglasjes voor de patiënt toe. Zorg ervoor dat het weefseltype is ingesteld op **Test tissue**.
12. Controleer of het afgiftevolumen **150 µL** bedraagt en dat het preparatieprotocol is ingesteld op **\*Dewax**.
13. Selecteer de kleuringsmoduswaarden **Single** en **Oracle** (klik niet op **Oracle control**).
14. Selecteer het proces **IHC**.
15. Selecteer **\*HER2 Negative Control** in de lijst met markeerstoffen. Op het tabblad Protocols zal automatisch het juiste kleuringsprotocol (**\*IHC Protocol H**) en het HIER-protocol (**\*HIER 25 min with ER1 (97)**) worden ingesteld.
16. Klik op **Add slide**. Hierop wordt het objectglasje met negatieve controle-reagens gemaakt.
17. Selecteer in hetzelfde venster (Add slide) de optie **\*HER2 Primary Antibody** in de lijst met markeerstoffen. De standaardprotocollen en alle overige instellingen blijven ongewijzigd.
18. Klik op **Add slide**. Hierop wordt het test-objectglasje gemaakt.
19. Herhaal stap 8 tot en met 18 totdat alle weefselmonsters en test-objectglasjes van patiënten zijn gemaakt.
20. Maak vervolgens de HER2 Control Slide. Voeg deze toe aan het vorige weefselmonster of maak afhankelijk van uw laboratoriumpraktijk een nieuw weefselmonster aan voor controle-objectglasjes.
 

**Belangrijk:** Het Een vereiste van het Bond Oracle HER2 IHC System is dat een HER2 Control Slide wordt opgenomen in elke run (d.w.z. lade met objectglasjes) voor het valideren van de analyse.
21. Stel in het venster Add slide het weefseltype in op **Positive tissue**.
22. Klik op **Oracle control**.
23. Selecteer het partijnummer van de HER2 Control Slide in de lijst **Lot No**. Het partijnummer wordt vermeldt op het labelgedeelte van het objectglasje.
 

**Belangrijk:** De HER2 Control Slide moet afkomstig zijn van hetzelfde Bond Oracle HER2 IHC System dat zal worden gebruikt.

24. Selecteer in de lijst met markeerstoffen de optie **\*HER2 Primary Antibody**. Behoud de instellingen voor het afgiftevolumen, de kleuringsmodus, de verwerking en het gebruikte protocol.
25. Klik op **Add slide** om de HER2 Control Slide toe te voegen.
26. Voeg ten slotte een controle-objectglasje met bedrijfseigen positief controleweefsel toe.
27. Maak de selectie van **Oracle control** ongedaan.
28. Selecteer in de lijst met markeerstoffen de optie **\*HER2 Primary Antibody**. Behoud de instellingen voor het afgiftevolumen, de kleuringsmode, de verwerking en het gebruikte protocol. Het weefseltype blijft **Positive tissue**.
29. Klik op **Add slide**. Hiermee is de aanmaak van het objectglasje voltooid.
30. Druk de labels voor objectglasjes af. Alle labels voor Oracle-objectglasjes zijn bedrukt met de tekst "OC". Het label voor de HER2 Control Slide omvat tevens het partijnummer van het Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Voorzie de objectglasjes van het juiste label.
32. Open de deksels van alle containers van het Bond Oracle HER2 IHC System en voer de reagenslade in het BOND-systeem in.
33. Breng objectglasjes in de lade aan in de volgorde die is aangegeven in kolom D van tabel 2. Breng nieuwe dekglasjes aan.
34. Voer de lade met objectglasjes in het BOND-systeem in en druk op de knop **Load/Unload**.
35. Controleer of de objectglasjes zijn gescand, en klik vervolgens op de knop **Run (Play)** in het venster System status.
36. Controleer of in het veld Tray indicator de status **Proc (OK)** wordt weergegeven, en of het batchnummer en het tijdstip van voltooiing worden weergegeven.
37. Wanneer de run is voltooid, drukt u op de knop **Load/Unload** en verwijdert u de laden met objectglasjes uit het BOND-systeem.
38. Verwijder de dekglasjes en spoel de objectglasjes af met gedesioniseerd water.
39. Droog, reinig en monteer de coupes.

## Kwaliteitscontrole

Verschillen in de fixatie, verwerking en inbedding van weefsel in het laboratorium van de gebruiker kunnen zorgen voor aanzienlijke variabiliteit van de resultaten. Dit vereist een regulier gebruik van bedrijfseigen controles naast de HER2 Control Slides die door Leica Biosystems zijn aangeleverd binnen het Bond Oracle HER2 IHC System. Raadpleeg de richtlijnen voor kwaliteitscontrole van het Certification Program for Immunohistochemistry van de College of American Pathologists (CAP). Zie ook de Approved Guideline (17) en Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18) van de CLSI (voorheen NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry. Raadpleeg daarnaast tabel 3 voor de verschillende soorten immunohistochemische kwaliteitscontroles en hun doeleinden.

Monster*	Beschrijving	HER2 Primary Antibody -kleuring	HER2 Negative Control-kleuring
<b>HER2 Control Slide</b>	Zoals aangeleverd in het Bond Oracle HER2 IHC System.	Regelt de kleuringsprocedure en geeft de geldigheid aan van de reagensprestatie.	Detectie van niet-specifieke achtergrondkleuring
<b>Bedrijfseigen positief controleweefsel</b>	Weefsel dat doelantigeen bevat. De ideale controle is zwak positief kleuringsweefsel, zodat subtiele wijzigingen in de gevoeligheid van primaire antilichamen kunnen worden gedefinieerd.	Regelt alle stappen van de analyse. Valideert de preparatie van weefsel en de kleuringsprestatie van het Bond Oracle HER2 IHC System.	
<b>Component van bedrijfseigen negatief controleweefsel</b>	Weefsels of cellen die naar verwachting negatief zijn (kunnen worden aangetroffen in componenten van patiëntenweefsel of positief/negatief controleweefsel).	Detectie van niet-specifieke kruisreactiviteit van antilichamen met cellen/celcomponenten.	

\*Gefixeerd en verwerkt op basis van het patiëntmonster

Tabel 3. Immunohistochemische kwaliteitscontroles en hun doel

Het controleweefsel moet een biopsiemonster of chirurgische monster omvatten, zo snel mogelijk in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed worden, op dezelfde manier als de patiëntmonster(s). Er moet op juiste wijze met de monsters worden omgegaan om de antigene potentie van weefsel voor immunohistochemische kleuring te behouden. Voor alle monsters (17) moeten standaardmethoden voor het verwerken van weefsel worden toegepast.

### HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Elk van de aangeleverde HER2 Control Slides bevat vier in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde kernen van menselijke borstkanker-cellijnen met kleuringsintensiteitsscores van 0, 1+, 2+ en 3+. In elke testrun (d.w.z. lade met objectglasjes) moet één objectglasje worden gebruikt. De juiste evaluatie van de HER2 Control Slide die door Leica Biosystems is aangeleverd, geeft de geldigheid van de test aan (zie de Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). De HER2 Control Slides die bij dit systeem worden geleverd valideren alleen de reagensprestatie en verifiëren niet de weefselpreparatie.

## Bedrijfseigen positief controleweefsel – HER2 Primary Antibody

Als componenten van bedrijfseigen positief controleweefsel worden gebruikt, moeten ze een biopsiemonster of chirurgisch monster omvatten en zo snel mogelijk worden gefixeerd, verwerkt en ingebed, op dezelfde manier als de patiëntmonster(s). Positieve weefselcontroles geven aan dat weefsels op juiste wijze zijn geprepareerd en dat geldige kleuringstechnieken zijn gebruikt. Voor elke testrun moet minimaal één positieve controlecomponent worden gebruikt. De positieve controlecoupe moet een zwak positieve kleuring vertonen om de subtiele veranderingen in de gevoeligheid van primaire antilichamen aan te geven.

**N.B:** Bekende componenten van positief controleweefsel mogen alleen worden gebruikt voor het bewaken van de juiste prestatie van verwerkte weefsels in combinatie met testreagentia, en NIET als een hulpmiddel voor het formuleren van een specifieke interpretatie van patiëntmonsters. Als het positieve controleweefsel geen juiste positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die op basis van patiëntmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Een controleblok met meerdere weefsels die tumoren bevatten waarop alle 4 HER2-niveaus zijn vertegenwoordigd kan eveneens op effectieve wijze worden gebruikt als geschikt bedrijfseigen controlemateriaal.

## Component van bedrijfseigen negatief controleweefsel – HER2 Primary Antibody

Indien bedrijfseigen negatieve controlecomponenten worden gebruikt, moeten deze verse biopsiemonsters of chirurgische monsters omvatten die zo snel mogelijk zijn gefixeerd, verwerkt en ingebed, op dezelfde manier als de/het patiëntmonster(s). Door gebruik te maken van controleweefsel dat bekend staat als negatieve HER2 oncoproteïne kan voor elke kleuringrun de specificiteit van het primaire antilichaam worden geverifieerd, en wordt een indicatie gegeven van eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring. De verscheidenheid aan celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn levert interne negatieve controlelocaties op (dit dient door de gebruiker te worden geverifieerd). Normale borstkanalen die niet met tumoren in verband staan, kunnen dienen als referentie voor de geldigheid van de analyse. Indien specifieke kleuring binnen het interne negatieve controleweefsel optreedt, moeten de resultaten die met de patiëntmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Een controleblok met meerdere weefsels waarop alle vier HER2-varianten zijn vertegenwoordigd kan worden gebruikt voor zowel negatieve als positieve controleweefsels.

## Patiëntweefsel – HER2 Negative Control

Gebruik voor elke patiënttest de aangeleverde HER2 Negative Control in plaats van de HER2 Primary Antibody op de desbetreffende coupe om niet-specifieke kleuring te evalueren en om een juiste interpretatie mogelijk te maken van specifieke kleuring van het oncoproteïne HER2 op de antigene plaats.

## Patiëntweefsel – HER2 Primary Antibody

De positieve kleuringsintensiteit moet worden geëvalueerd binnen de context van eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring met de HER2 Negative Control. Net zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent dus niet dat het antigeen afwezig was in de geanalyseerde cellen/het geanalyseerde weefsel. Zie **Slide Screening Order Rationale, Limitations, Performance Evaluation** en **Immunoreactivity** voor specifieke informatie over de immunoreactiviteit van het Bond Oracle HER2 IHC System.

## Verificatie van de analyse

Alvorens een antilichaam- of kleuringssysteem te gebruiken voor een diagnostische procedure, moet de gebruiker de specificiteit van het antilichaam te verifiëren door het te testen op een reeks van bedrijfseigen weefsels met bekende positieve en negatieve immunohistochemische profielen. Zie de eerdere beschreven **Kwaliteitscontrole** en de kwaliteitscontrole-richtlijnen van het CAP Certification Program for Immunohistochemistry en/of de Approved Guideline (12) van de CLSI (voorheen NCCLS) Quality Assurance voor Immunocytochemistry. Deze kwaliteitscontroleprocedures moeten voor elke nieuwe partij antilichamen worden herhaald. Dit geldt tevens voor gevallen waarin sprake is van een wijziging van de analyseparameters. Menselijke invasieve (infiltrerend) ductaal borstcarcinoom met bekende kleuringsintensiteiten van het oncoproteïne HER2 van 0 tot 3+ en andere geschikte negatieve weefsels zijn geschikt voor het verifiëren van de analyse.

## Interpretatie van kleuring - Borst

Voor het vaststellen van de expressie van het oncoproteïne HER2 mogen alleen het kleuringspatroon van het membraan en de intensiteit worden geëvalueerd aan de hand van de schaal die in tabel 4 is uiteengezet. De evaluatie van het objectglaasje moet worden uitgevoerd door een patholoog met behulp van een helder-veldmicroscoop. Voor de evaluatie van de immunohistochemische kleuring en het toekennen van scores dient een objectief met een vergrotingsfactor van 10x te worden gebruikt. Ter bevestiging van de score moet een objectiefvergrotingsfactor van 20–40x worden gebruikt. Cytoplasmatische kleuring moet als niet-specifieke kleuring worden beschouwd, en mag niet worden opgenomen in de evaluatie van de kleuringsintensiteit van het membraan (19). Raadpleeg voor hulp bij het onderscheiden van de kleuringsniveaus 0, 1+, 2+ en 3+ de Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide. In deze interpretatiegids vindt u representatieve afbeeldingen van de kleuringsintensiteiten. Alleen monsters van patiënten met invasieve borstcarcinooma mogen van een score worden voorzien. Als binnen hetzelfde monster sprake is van zowel carcinooma *in situ* als invasieve carcinooma, mag alleen de invasieve component van een score worden voorzien.

Immunohistochemisch kleuringspatroon	Score	Evaluatie
Er wordt geen kleuring geobserveerd, of er wordt in minder dan 10% van de tumorcellen een kleuring van het membraan geobserveerd.	0	Negatief
In meer dan 10% van de tumorcellen wordt lichte/nauwelijks merkbare kleuring van het membraan gedetecteerd. Slechts een gedeelte van het membraan van de cellen is gekleurd.	1+	Negatief
In meer dan 10% van de tumorcellen wordt zwakke tot matige volledige kleuring van het membraan geobserveerd.	2+	Geen uitsluitel (matig positief)
Een krachtige volledige kleuring van het membraan wordt geobserveerd in meer dan 10% van de tumorcellen.	3+	Sterk positief

Tabel 4. Interpretatie van HER2-kleuring

De kleuringsresultaten voor het Bond Oracle HER2 IHC System worden geïnterpreteerd als negatief met betrekking tot de expressie van het oncoproteïne HER2 bij een kleuringsintensiteitsscore van 0 of 1+, geen uitsluitel (matig positief) bij een kleuringsintensiteitsscore van 2+ en sterk positief bij een kleuringsintensiteitsscore van 3+. Het Bond Oracle HER2 IHC System is niet bestemd voor het leveren van prognostische informatie aan de patiënt en/of arts, en is niet voor dat doel gecontroleerd. Voor elke kleuringsevaluatie moeten objectglaasjes in de hieronder aangegeven volgorde worden onderzocht om de geldigheid van de kleuringsrun vast te stellen en om een semikwantitatieve evaluatie van de kleuringsintensiteit van het monsterweefsel mogelijk te maken.

## Interpretatie van kleuring - maag

Voor het vaststellen van de expressie van het oncoproteïne HER2 mogen alleen het kleuringpatroon van het membraan en de intensiteit worden geëvalueerd aan de hand van de schaal die in tabel 5 en 6 uiteen is gezet. De evaluatie van het objectglasje moet worden uitgevoerd door een patholoog met behulp van een helder-veldmicroscop. Voor de evaluatie van de immunohistochemische kleuring en het toekennen van scores dient een objectief met een vergrotingsfactor van 10x te worden gebruikt. Ter bevestiging van de score moet een objectiefvergrotingsfactor van 20–40x worden gebruikt. Cytoplasmatische kleuring moet als niet-specifieke kleuring worden beschouwd en mag niet worden opgenomen in de evaluatie van de kleuringsintensiteit van het membraan (15). Raadpleeg voor hulp bij het onderscheiden van de kleuringsniveaus 0, 1+, 2+ en 3+ de Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide. In deze interpretatiegids vindt u representatieve afbeeldingen van de kleuringsintensiteiten. Alleen monsters van patiënten met een adenocarcinoom in de maag of de gastro-oesofageale overgang mogen van een score worden voorzien.

	<b>Immunohistochemisch kleuringpatroon</b>	<b>Score</b>	<b>Evaluatie</b>
<b>Chirurgische monsters</b>	Er wordt geen kleuring geobserveerd, of er wordt in minder dan 10% van de tumorcellen een kleuring van het membraan geobserveerd.	0	Negatief
	In meer dan 10% van de tumorcellen wordt lichte/nauwelijks merkbare kleuring van het membraan gedetecteerd. Slechts een gedeelte van het membraan van de cellen is gekleurd.	1+	Negatief
	In (meer dan) 10% van de tumorcellen wordt zwakke tot matige volledige, basolaterale of laterale kleuring van het membraan waargenomen.	2+	Geen uitsluitel (matig positief)
	In meer dan 10% van de tumorcellen wordt een krachtige volledige, basolaterale of laterale kleuring van het membraan waargenomen.	3+	Sterk positief

Tabel 5. Interpretatie van HER2-kleuring in chirurgische maagkanker-monsters

	<b>Immunohistochemisch kleuringpatroon</b>	<b>Score</b>	<b>Evaluatie</b>
<b>Biopsiemonsters</b>	In geen enkele tumorcel is kleuring waarneembaar	0	Negatief
	Er wordt een tumorcelcluster met flauwe/nauwelijks waarneembare kleuring van het membraan waargenomen, ongeacht het percentage gekleurde cellen	1+	Negatief
	Er wordt een tumorcelcluster met zwakke tot matige volledige, basolaterale of laterale kleuring van het membraan waargenomen, ongeacht het percentage gekleurde cellen	2+	Geen uitsluitel (matig positief)
	Er wordt een tumorcelcluster met sterke volledige, basolaterale of laterale kleuring van het membraan waargenomen, ongeacht het percentage gekleurde cellen	3+	Sterk positief

Tabel 6. Interpretatie van HER2-kleuring in maagkanker-biopsiemonsters

Voor interpretatie van gekleurde Bond Oracle HER2 IHC System bipten wordt een cluster van ten minste vijf tumorcellen aanbevolen.

## Verklaring van de controlevolgorde voor objectglasjes

Objectglasjes moeten in de onderstaande volgorde worden gecontroleerd:

### 1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Een geldige analyse met de Oracle HER2 Control Slide toont het volgende:

- De aanwezigheid van een krachtig bruine, volledige kleuring van het membraan in de 3+ controle-cel lijn SK-BR-3.
- De aanwezigheid van zwakke tot matige bruine, volledige kleuring van het membraan in de 2+ controle-cel lijn MDA-MB-453.
- De aanwezigheid van lichte/nauwelijks merkbare bruine, onvolledige kleuring van het celmembraan in de 1+ controle-cel lijn, MDA-MB-175.
- Geen kleuring in de 0 controle-cel lijn MDA-MB-231.

**Belangrijk:** Een functie van de MDA-MB-175 1+ controle-cel lijn is een duidelijk groeipatroon waarin de cellen clusters vormen. Deze clusters zorgen voor een voortdurende luminale borstelzoom binnen de celcluster. Deze kleuring van de borstelzoom zal krachtiger zijn dan de rest van het celmembraan. De lichte/nauwelijks merkbare onvolledige kleuring van het celmembraan is het juiste 1+ kleuringspatroon voor het oncoproteïne HER2. In deze cel lijn kan eveneens een stippelachtige immunokleuring van de Golgi-regio in het cytoplasma worden geobserveerd.

### 2. Bedrijfseigen positief controleweefsel – HER2 Primary Antibody

Er moet een AANWEZIGHEID van bruine membraankleuring worden geobserveerd overeenkomstig de bekende status van het oncoproteïne HER2 van de geselecteerde positieve controle.

### 3. Component van bedrijfseigen negatief controleweefsel – HER2 Positive Control

De AFWEZIGHEID van membraankleuring moet worden geobserveerd. Een component van een negatief controleweefsel bevestigt het gebrek aan kruisreactiviteit van een detectiesysteem met betrekking tot gerichte cellen/celcomponenten. Als membraankleuring optreedt in een component van een negatief controleweefsel, moeten de resultaten voor het patiëntmonster als ongeldig worden beschouwd.

### 4. Patiëntweefsel – gekleurd met behulp van de HER2 Negative Control

De AFWEZIGHEID van membraankleuring verifieert de specifieke labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam. Andere bruine kleuring die optreedt in het cytoplasma van het monster dat wordt behandeld met de HER2 Negative Control, zoals in het geval van bindweefsel, leukocyten, erythrocyten of necrotisch weefsel, moeten als niet specifieke achtergrondkleuring worden beschouwd. Hiervan moet aantekening worden gemaakt.

### 5. Patiëntweefsel – gekleurd met behulp van de HER2 Primary Antibody

Expressieniveaus van het oncoproteïne HER2 worden vastgesteld op basis van de criteria die zijn gedefinieerd in tabel 4-6 en in de Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

## Beperkingen

### A. Algemene beperkingen

Immunohistochemie is een in een laboratorium gebaseerde techniek die meerdere stappen omvat en wordt gebruikt als hulpmiddel bij de interpretatie en vaststelling van histopathologische kenmerken. Het is een techniek die speciale training vereist ten aanzien van alle aspecten van de procedure (zoals het maken van de juiste keuzes met betrekking tot de reagentia, weefsel, fixering, verwerking en voorbereiding van IHC-objectglasjes) en de interpretatie.

Immunohistochemische kleuring van weefsel is afhankelijk van de voorbereiding, fixering en verwerking van het weefsel voor kleuring. Een onjuiste manier van fixeren, invriezen, ontdooien,

wassen, drogen, verwarmen en opdelen of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kunnen leiden tot artefacten, het vastzitten van antilichamen of fout-negatieven. Inconsistente resultaten kunnen het gevolg zijn van variaties in de methoden die voor het fixeren en inbedden worden gebruikt of van inherente onregelmatigheden binnen het weefsel (21). Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan eveneens een juiste interpretatie van de resultaten in te weg zitten. Eventuele niet-specifieke kleuring heeft meestal een diffuus uiterlijk. Daarnaast kan in coupes sporadische kleuring van bindweefsel worden geobserveerd. Dit treedt op als gevolg van overdadig fixeren van weefsel met formaline. Maak voor de interpretatie van kleuringsresultaten gebruik van intacte cellen. Necrotische of gedegenerende cellen raken vaak niet-specifiek gekleurd (22). Er kan sprake zijn van fout-positieven als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen eveneens worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten) of endogene peroxidase (cytochroom C), afhankelijk van het gebruikte type immunohistochemische kleuring.

Weefsels van patiënten die zijn geïnfecteerd met het hepatitis B-virus en het oppervlakteantigeen van het hepatitis B-virus (HBsAg) bevatten, vertonen mogelijk niet-specifieke kleuring met mierikswortelperoxidase (23).

Onverwachte immunohistochemische kleuring of variaties in de kleuring kunnen het gevolg zijn van wijzigingen van de expressieniveaus van de coderingsgenen of antigenen. Elke wijziging in de verwachte kleuringspatronen moet worden geïnterpreteerd in verband met alle andere diagnostische onderzoeksactiviteiten.

De interpretatie van immunohistochemische kleuring moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en het gebruik van relevant controlemateriaal, en moet worden geëvalueerd binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventuele andere diagnostische tests door een gekwalificeerde patholoog.

De prestatie van de analyse (d.w.z. evaluaties van de geschiktheid van de positieve en negatieve controles) en de interpretatie van eventuele immunohistochemische kleuring of de afwezigheid ervan moet worden uitgevoerd in een toepasselijk geaccrediteerd/gelicenseerd laboratorium onder de supervisie van een relevant gekwalificeerde en ervaren patholoog die verantwoordelijk is voor de algehele evaluatie van de immunohistochemische analyse en de interpretatie daarvan.

## B. Productspecifieke beperkingen

Dit product is niet bestemd voor gebruik voor doorstroomcytometrie. Er zijn geen prestatiekenmerken vastgesteld voor doorstroomcytometrie.

Er kan sprake zijn van fout-negatieven als gevolg van een degradatie van de antigenen in de weefselcoupe. De objectglasjes die zijn vereist voor de evaluatie van het oncoproteïne HER2 en de tumorverificatie moeten tegelijkertijd worden geprepareerd. Om de antigene potentie te behouden, moeten weefselcoups die zijn gemonteerd op objectglasjes (Leica BOND Plus Slides – productcode S21.2113) binnen 4 tot 6 weken van coupure worden gekleurd indien bewaard op kamertemperatuur (18–24 °C). Na het couperen wordt het aanbevolen om objectglasjes gedurende een periode van 12–18 uur (een nacht lang) te incuberen op een temperatuur van 37 °C. Gedeeltes die verdere adhesie vereisen kunnen een extra uur worden geïncubeerd op 60 °C.

Er zal een minimale natuurlijke variatie van het immunohistochemische profiel te zien zijn tussen groeibatches van cellijnen die binnen het Bond Oracle HER2 IHC System worden gebruikt. Deze natuurlijke variatie bevindt zich ruim binnen acceptabele tolerantieniveaus voor een biologische entiteit en is niet van invloed op de interpretatie of prestatie van het systeem.

Op de typering van de cellijnen met behulp van zowel doorstroomcytometrie als in situ hybridisatie volgens tabel 7 is eveneens natuurlijke biologische variatie van toepassing. Technische en interpretatiegerelateerde variatie van controle-cellijnen zoals geëvalueerd door fluorescente in situ hybridisatie wordt eveneens gerapporteerd (24).

De evaluatie van de HER2 Control Slides moet daarnaast rekening houden met alle relevante uiterste houdbaarheidsdatums. Sla het Bond Oracle HER2 IHC System op bij een temperatuur van 2–8 °C. Vries het niet in. Laat het systeem direct na gebruik terugkeren naar een temperatuur van 2–8 °C. Alle afwijkingen van deze voorwaarden zullen de analyse ongeldig maken.



Vervang Bond Oracle HER2 IHC System-reagentia niet door andere componenten van Leica Biosystems of andere fabrikanten. Hierdoor zal de analyse ongeldig worden.

Het is van cruciaal belang dat alle stappen die in gedeeltes C tot en met E (procedure) worden beschreven in de voorgeschreven volgorde worden uitgevoerd. Elke afwijking van deze voorwaarden zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

Het is van cruciaal belang dat weefsels exclusief worden gefixeerd in fixeerstoffen op basis van formaline die voor de analyse worden gebruikt. Het gebruik van elk ander type fixeerstof zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

Weefselcoupes die buiten het aanbevolen diktebereik vallen, zijn niet gevalideerd. Het gebruik van elke andere coupedikte zal ertoe leiden dat de analyse ongeldig wordt.

## Cellijnggegevens

Cellijn	Profiel Bond Oracle HER2 IHC System	Aantal HER2-receptoren per cel*	HER2 genamplificatiestatus*	
			Aantal HER2-kopieën	Genverhouding HER2:Chr17
SK-BR-3	3+	4,3x10 <sup>5</sup>	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4x10 <sup>5</sup>	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3x10 <sup>4</sup>	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3x10 <sup>3</sup>	3,15	1,13

\*Analyse van het aantal HER2-receptoren zoals beoordeeld op basis van doorstroomcytometrie. \* HER2-genamplificatiestatus zoals beoordeeld op basis van een dubbele controle (HER2:chromosoom 17) FISH.

Tabel 7. Profiel van HER2 Control Slide

## Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met Dako HercepTest - Borst

Het eerste deel van het onderzoek had betrekking op de geschiktheid van het Bond Oracle HER2 IHC System als hulpmiddel voor het bepalen van een voor gebruik als een hulpmiddel om een behandeling met Herceptin® (trastuzumab) te bepalen. Het onderzoek had ten doel om de concordantie te onderzoeken tussen het Bond Oracle HER2 IHC System en de Dako HercepTest, die wordt beschouwd als de "gouden standaard" voor deze analyse. Het acceptatiecriterium werd gedefinieerd als een algehele concordantie tussen de twee tests van meer dan 75%, met een betrouwbaarheidsinterval (Confidence Interval of CI) van 95%.

Het onderzoek werd uitgevoerd als een blinde evaluatie op twee locaties in de Verenigde Staten. Elke onderzoekslocatie ontving in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde borstkankermonsters waarvan de HER2-status bekend was. De weefselmonsters werden geselecteerd in omgekeerde volgorde ten opzichte van de klinische archieven. De monsters vertegenwoordigden de opeenvolgende reeks van weefselmonsters die een histopathologieafdeling voor klinisch onderzoek ontvangt, en werden onafhankelijk van andere prognostische en/of voorspellende factoren getest, zonder systematische vertekeningen in de cohort. Cohorten van 160 en 292 monsters werden getest op respectievelijk Locatie 1 en Locatie 2. Elke cohort kenmerkte zich door een gelijke verhouding van weefselmonsters met de score geen uitsluitel/positief (2+, 3+) en negatief (0, 1+). Deze verhouding was gebaseerd op eerder toegekende HER2 IHC-scores. Dit resulteerde in een totale onderzoekspopulatie van 452 monsters. Twaalf monsters werden ongeschikt geacht vanwege een gebrek aan voldoende invasieve tumor. Deze monsters werden uit het onderzoeksmateriaal verwijderd. Nog eens negen monsters konden niet van een score worden voorzien doordat weefsel werd opgetild van het oppervlak van het objectglaasje. Dit resulteerde in een uiteindelijke onderzoekspopulatie van 431 monsters.

Alle weefselmonsters werden gekleurd met de HercepTest volgens de instructies van de fabrikant die in de bijsluiter waren vermeld. Een opeenvolging van coupes van elk weefselmonster werd gekleurd met behulp van het Bond Oracle HER2 IHC System binnen een volledig geautomatiseerd, geavanceerd BOND-kleuringsstelsel van Leica Biosystems. Alle weefselmonsters werden ontkoppeld van unieke informatie die tot patiënten kon worden herleid en werden vergezeld door

klinische gegevens met betrekking tot de grootte van de tumor, het stadium van de tumor, de tumorklasse en de status van de oestrogeenreceptor.

Alle gekleurde objectglasjes werden geblindeerd en in willekeurige volgorde van een score voorzien door getrainde observators op twee locaties. Voor de 2x2 concordantieanalyse werden scores geïnterpreteerd als negatief bij een kleuringsintensiteit van 0 of 1+, en positief voor scores van 2+ of 3+. Voor de 3x3 concordantieanalyse werden scores als negatief geïnterpreteerd bij een kleuring van 0 of 1+, geen uitsluitel voor scores van 2+ en positief voor scores van 3+. Vervolgens werden gegevens geanalyseerd voor positieve kleurovereenkomst en negatieve kleurovereenkomst.

## 2x2 concordantieresultaten

Tijdens deze primaire analyse worden de testresultaten voor de twee tests (Bond Oracle HER2 IHC System en Dako HercepTest) aangemerkt als negatief (0,1+) of positief (2+, 3+). De frequenties van vier mogelijke combinaties worden weergegeven in een 2x2 tabelformaat (zie tabel 8). Vervolgens werd de algehele concordantieratio berekend aan de hand van deze 2x2-tabel, vergezeld van een met 95% exact betrouwbaarheidsinterval (gebaseerd op de binomiale distributie). De nulhypothese ( $H_0$ ) waartegen de succescriteria worden afgezet is dat de concordantie niet meer bedraagt dan 75%.

De voor 431 monsters geobserveerde overeenkomsten tussen de twee tests in een 2x2-analyse wijzen op een concordantie van 92,34% (398 per 431) met een 95% CI van 89,42% - 94,67%. Deze gegevens bieden ondersteuning voor de weerlegging van de nulhypothese ( $H_0$ ) dat de overeenkomst niet meer bedroeg dan 75% bij een p-waarde <0.0001.

Het percentage Positieve Overeenkomst (gevoeligheid) of het vermogen van het Bond Oracle HER2 IHC System om de positieve HercepTest-weefselmonsters correct te identificeren (het percentage monsters van alle positieve HercepTest-weefselmonsters die positief scoorden bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als de HercepTest) bedroeg 84,87% (129 van 152) met een 95% CI van 78,17%-90,16%. Het percentage Negatieve Overeenkomst (specificiteit) of het vermogen van de test om negatieve HercepTest-cases correct te identificeren (het percentage monsters van alle negatieve HercepTest-monsterweefsels die negatief scoorden bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als de HercepTest ) bedroeg 96,42% (269 van 279) met een 95% CI van 93,51%-98,27%.

		HercepTest		
		Negatief	Positief	Totalen
Bond Oracle HER2 IHC System	Negatief	269	23	292
	Positief	10	129	139
	Totalen	279	152	431

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

Tabel 8. 2x2 concordantie van het Bond Oracle HER2 IHC System met de HercepTest

## 3x3 concordantieresultaten

De gegevens werden gegroepeerd als negatief (0 of 1+), geen uitsluitel (2+) of positief (3+) voor 3x3-analyse en toonden een concordantie van 86,54% (373 van 431), met een 95% CI van 82,95% tot 89,62%. Om deze reden werd de nulhypothese ( $H_0$ ) dat de overeenkomst niet meer bedroeg dan 75% weerlegd bij een p-waarde  $<0.0001$ .

Het percentage Positieve Overeenkomst voor 3+ (het percentage monsters van alle 3+ positieve HercepTest-weefselmonsters die 3+ positief scoorden bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als de HercepTest) bedroeg in dit onderzoek 73,33% (66 van 90), met een 95% CI van 62,97% tot 82,11%. Het percentage negatieve overeenkomst bedroeg 96,42% (269 van 279), met een 95% CI van 93,51% tot 98,27. Zie tabel 9.

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

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

Tabel 9. 3x3-concordantie van het Bond Oracle HER2 IHC System met de HercepTest

Samenvattend tonen de gegevens die op basis van dit onderzoek werden gegenereerd aan dat het Bond Oracle HER2 IHC System kan worden gebruikt als hulpmiddel voor het vaststellen van de behandeling met Herceptin® (trastuzumab) op basis van zijn hoge concordantie met de HercepTest.

### Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met de PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Borst

Deel 2 van het onderzoek had ten doel om de concordantie tussen het Bond Oracle HER2 IHC System en de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit te analyseren. De laatste wordt beschouwd als de "gouden standaard" voor het evalueren van genevaluatiereflex-analyses in samenhang met HER2-immunohistochemie.

Dit onderzoek werd uitgevoerd op dezelfde onderzoekslocaties. Er werd gebruikgemaakt van hetzelfde onderzoekscohort als in deel 1. Alle weefselmonsters werden gekleurd met de Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit volgens de instructies van de fabrikant die in de bijsluiter waren vermeld. Opeenvolgende coupes van elk weefselmonster werden gekleurd met het Bond Oracle HER2 IHC System binnen een volledig geautomatiseerd, geavanceerd BOND-kleuringssysteem (dat werd gebruikt in deel 1 van het klinische onderzoek). Van de 431 gekleurde weefselmonsters werd in gevallen geen resultaat verkregen als gevolg van onvoldoende controlehybridisatie. Dit resulteerde in een cohort van 428 weefselmonsters.

Alle gekleurde objectglasjes werden van een score voorzien door vakkundige observatoren op de twee onderzoekslocaties. Voor de 3x2-concordantieanalyse werden de scores geïnterpreteerd als negatief indien de HER2/CEP17-genamplificatieratio lager uitviel dan ( $<$ ) 2,0 en positief indien groter dan of gelijk aan ( $>$ ) 2,0 na een telling van 20 tumorcellen.

### 3x2 concordantieresultaten

De geobserveerde overeenkomst voor 428 monsters tussen de twee tests in een 3x2-analyse toonde een concordantie van 87,6% (375 van 428), met een 95% CI van 84% tot 90%.

Het percentage Positieve Overeenkomst (gevoeligheid) of het vermogen van het Bond Oracle HER2 IHC System om de positieve PathVysion-weefselmonsters correct te identificeren (het percentage monsters dat een positieve score kreeg van zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als PathVysion van alle positieve PathVysion-weefselmonsters) bedroeg 93,8% (61+30 van 97), met een 95% CI van 86,8% tot 97,4%.

Het percentage Negatieve Overeenkomst (specificiteit) of het vermogen van de test om negatieve PathVysion-weefselmonsters correct te identificeren (het percentage monsters van alle negatieve PathVysion-weefselmonsters dat een negatieve score ontving van zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als PathVysion ) bedroeg 85,8% (284 van 331), met een 95% CI van 81,6% tot 89,2%. Zie tabel 10.

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

Algehele concordantie (95% CI) = 87,6% (84 tot 90%)

Tabel 10. 3x2 concordantie van kleuring met het Bond Oracle HER2 IHC System met de PathVysion HER-2 DNA Probe kit.

## Klinische concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System met Ventana

## Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Maag

Doel van deel 3 van het onderzoek was het genereren van data van met in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde gevorderde-maagkankermonsters, om de concordantie te onderzoeken tussen het volledig geautomatiseerde Bond Oracle HER2 IHC System binnen het volledig geautomatiseerde geavanceerde BOND-kleuringssysteem en het Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Het acceptatiecriterium voor deel drie werd gedefinieerd als meer dan 75% totale concordantie tussen de twee tests.

Voor de 2x2 concordantieanalyse werden scores geïnterpreteerd als negatief bij een kleuringsintensiteit van 0 of 1+, en positief voor scores van 2+ of 3+. Voor de 3x3 concordantieanalyse werden scores als negatief geïnterpreteerd bij een kleuring van 0 of 1+, geen uitsluitel voor scores van 2+ en positief voor scores van 3+. Ook werden gegevens geanalyseerd voor positieve kleurovereenkomst en negatieve kleurovereenkomst.

## Resultaten - Bond Oracle HER2 IHC System vs. Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Maag

### 2x2 concordantieresultaten

Concordantie tussen het volledig geautomatiseerde Bond Oracle HER2 IHC System met behulp van het volledig geautomatiseerde geavanceerde BOND-kleuringssysteem en de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) werd gevonden voor 287 monsters.

De waargenomen concordantie tussen de twee tests in een 2x2 analyse was 95,12% (273/287) met een 95% CI van 91,95% - 97,31%. Deze gegevens bieden ondersteuning voor de weerlegging van de nulhypothese ( $H_0$ ) dat de overeenkomst niet meer bedroeg dan 75% bij een p-waarde <0.0001. Het percentage positieve overeenkomst (gevoeligheid) oftewel het vermogen van het Bond Oracle HER2 IHC System om de positieve monsters van Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) correct te identificeren (het percentage monsters met een positieve score bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) van alle positieve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) monsters) was 90,79% (138/152) met een 95% CI van 85,03%-94,87%. Het percentage negatieve overeenkomst (specificiteit) oftewel het vermogen van de test om negatieve monsters van Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) correct te identificeren (het percentage monsters met een negatieve score bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) van alle negatieve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) monsters) was 100% (135/135) met een 95% CI van 97,30%-100% (zie tabel 11).

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

**Totale concordantie (95% CI) = 95,12% (91,95%-97,31%)**

Tabel 11. 2x2 concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System kleuring met Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody op maagweefsel.

### 3x3 concordantieresultaten

De waargenomen concordantie tussen de twee tests in een 3x3 analyse was 89,90 % (258/287) met een 95 % CI van 85,81 % tot 93,13 %. Om deze reden werd de nulhypothese ( $H_0$ ) dat de overeenkomst niet meer bedroeg dan 75% weerlegd bij een p-waarde <0.0001. Het percentage positieve overeenkomst voor 3+ oftewel het vermogen van het Bond Oracle HER2 IHC System om de positieve monsters van Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) correct te identificeren (het percentage monsters met een 3+ positieve score bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) van alle positieve 3+ Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) monsters) in dit onderzoek was 85,94 % (110/128) met een 95 % CI van 78,69 % tot 91,45 %. Het percentage negatieve overeenkomst (specificiteit) oftewel het vermogen van de test om negatieve monsters van Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) correct te identificeren (het percentage monsters met een negatieve score bij zowel het Bond Oracle HER2 IHC System als Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) van alle negatieve Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) monsters) was 100 % (135/135) met een 95 % CI van 97,30 % tot 100 %. Zie tabel 12.

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

**Totale concordantie (95 % CI) = 89,90 % (85,81 %-93,13 %)**

Tabel 12. 3x3 concordantie van Bond Oracle HER2 IHC System kleuring met Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody op maagweefsel.

## Immunoreactiviteit – normaal panel

Normaal weefseltype	Kleuringspatroon	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Adrenaal	Negatief	Negatief
Hersens, cerebellum	Negatief	Negatief
Hersens, cerebellum	Negatief	Negatief
Borst	Negatief	Negatief
Beenmerg	Negatief	Negatief
Colon	Negatief	Negatief
Slokdarm	Negatief	Negatief
Oog	Negatief	Negatief
Hypofyse	Matige cytoplasmische kleuring geobserveerd in hypofysaire cellen (1/3)	Negatief
Nier	Negatief	Negatief
Strottehoofd	Negatief	Negatief
Lever	Negatief	Negatief
Long	Negatief	Negatief
Mesothelium	Negatief	Negatief
Eierstok	Negatief	Negatief
Alveesklier	Negatief	Negatief
Bijschildklier	Negatief	Negatief
Perifere zenuw	Negatief	Negatief
Prostaat	Negatief	Negatief
Speekselklier	Negatief	Negatief
Huid	Negatief	Negatief
Dunne darm	Negatief	Negatief
Milt	Negatief	Negatief
Maag	Zwakke cytoplasmische kleuring geobserveerd in maagklieren (2/3)	Negatief
Dwarsgestreepte spier	Negatief	Negatief
Teelballen	Negatief	Negatief
Thymusklier	Negatief	Negatief
Schildklier	Negatief	Negatief
Amandel	Negatief	Negatief
Baarmoederhals	Negatief	Negatief
Baarmoeder	Negatief	Negatief

Tabel 13. Kleuring van normaal panel

## Reproduceerbaarheidsonderzoek

## Precisietests tijdens en tussen runs

Er werden precisietests uitgevoerd bij Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Het weefsel dat hiervoor werd gebruikt, omvatte een in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde compositie tissue micro array (TMA) die werd aangeleverd door Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea) die kernen bevatte van invasief borstcarcinoomweefsel met een diameter van 20, 4 mm. De 20 weefselmonsters werden geselecteerd op basis van eerder toegekende HER2-scores. Op basis hiervan werden x5 weefselmonsters van HER2 3+, x5 weefselmonsters van HER2 2+, x5 weefselmonsters van HER2 1+ en x5 weefselmonsters van HER2 0 opgenomen.

### A. Precisietests tijdens runs

De precisietests binnen runs van de Bond Oracle HER2 IHC Systems werden geëvalueerd voor in totaal 40 achtereenvolgende coupes van een TMA die 20 invasieve borsttumoren en 40 HER2 Control Slides omvatte. Alle objectglasmaasjes werden gekleurd met het Bond Oracle HER2 IHC System binnen het volledig geautomatiseerde geavanceerde BOND-kleuringsstelsel. Objectglasmaasjes werden tijdens een onafgebroken periode gekleurd met behulp van een Bond Oracle HER2 IHC System die deel uitmaakte van dezelfde productiebatch. Gekleurde coupes werden geblindeerd en in willekeurige volgorde geëvalueerd door één ervaren observator met het doel om de precisie binnen de run vast te stellen.

Uit een evaluatie van de objectglasmaasjes voor het onderzoek binnen de run bleek dat 733 van de 800 (91,63%) testgegevenspunten konden worden geïnterpreteerd. 40 gegevenspunten werden uitgesloten omdat alleen DCIS aanwezig was. Nog eens 27 gegevenspunten konden niet worden geïnterpreteerd vanwege een verlies van invasieve tumor (specifiek voor 3 kernen). Bij 61 (8,32%) trad variatie in kleuring op, ten opzichte van 733 potentiële kleuringsevents. In 37 gevallen trad een variatie op van 3+ tot 2+ (n = 20) en van 1+ tot 0 (n = 17). In een 2x2 gegevensevaluatie zou dit dientengevolge geen wijziging van een klinisch positief in een klinisch negatief of omgekeerd vertegenwoordigen. De resterende 24 (3,27%) gevallen vertegenwoordigden een wijziging van een klinisch negatieve score (0 of 1+) in een klinische positieve score (2+ of 3+). Pass-waarde = 96,7% (95% CI = 95,15% tot 97,81%).

### B. Precisietesten tussen runs

De precisietests tijdens de run van het Bond Oracle HER2 IHC System werden geëvalueerd voor in totaal 24 achtereenvolgende coupes van een TMA dat 20 invasieve borsttumoren en 24 HER2 Control Slides omvatte. Alle objectglasmaasjes werden gekleurd met het Bond Oracle HER2 IHC System binnen het volledig geautomatiseerde geavanceerde BOND-kleuringsstelsel. De objectglasmaasjes werden geëvalueerd tijdens 8 onafhankelijke runs die op drie verschillende tijdstippen binnen hetzelfde laboratorium werden uitgevoerd met behulp van een Bond Oracle HER2 IHC System uit dezelfde productiebatch. De gekleurde objectglasmaasjes werden geblindeerd en in willekeurige volgorde geëvalueerd door één ervaren observator om de precisie tussen runs vast te stellen.

Uit een evaluatie van de objectglasmaasjes van het onderzoek tussen runs bleek dat 456 van de 480 (95,00%) testgegevenspunten kon worden geïnterpreteerd. 24 gegevenspunten konden niet worden geïnterpreteerd als gevolg van een verlies van invasieve tumoren (in het geval van 5 kernen). Variatie in kleuring trad op in 42 (9,21%) van 456 gegevenspunten. In 30 gevallen was er sprake van een variatie van 3+ tot 2+ (n = 10) en van 1+ tot 0 (n = 20). In een 2x2 gegevensevaluatie zou dit dientengevolge geen wijziging van een klinisch positief in een klinisch negatief of omgekeerd vertegenwoordigen. De resterende 12 (2,63%) vertegenwoordigden een wijziging van klinisch negatief (0 of 1+) in klinisch positief (2+ of 3+). Pass-waarde = 97,37% (95% CI = 95,90% tot 98,77%).

### C. Reproduceerbaarheid van partij tot partij

Om de reproduceerbaarheid tussen partijen vast te stellen, werden in 3 afzonderlijke gevallen



3 partijen Bond Oracle HER2 IHC Systems gefabriceerd onder GMP en geëvalueerd in combinatie met 24 coupes van borsttumoren (24 testgegevenspunten). Deze coupes werden afgenomen van vier verschillende in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselblokken (die 0, 1+, 2+ en 3+ HER2-kleuringsintensiteiten vertegenwoordigden) en drie HER2 Control Slides (12 controlegegevenspunten). Op drie verschillende momenten werden drie afzonderlijke runs binnen hetzelfde laboratorium uitgevoerd. Voor elke run werd gebruikgemaakt van een afzonderlijke productiepartij van het Bond Oracle HER2 IHC System. Alle objectglaasjes werden gekleurd met het Bond Oracle HER2 IHC System binnen een volledig geautomatiseerd geavanceerd BOND-kleuringsstelsel. De gekleurde objectglaasjes werden gemaskeerd en in willekeurige volgorde geëvalueerd door één getrainde observator om de reproduceerbaarheid van partij tot partij vast te stellen.

Uit een evaluatie van de objectglaasjes (test-objectglaasjes en controleglaasjes) tijdens het onderzoek van partij tot partij bleek dat 36 van de 36 gegevenspunten geïnterpreteerd konden worden. Er trad geen kleuringsvariatie op in de 36 gegevenspunten tussen de drie productiepartijen van het Bond Oracle HER2 IHC System. De kleuring met het Bond Oracle HER2 IHC System bleek binnen alle productiebatches consistent.

#### D. Reproduceerbaarheid tussen laboratoria

De tests van de reproduceerbaarheid tussen laboratoria van het Bond Oracle HER2 IHC System werden geëvalueerd op 3 locaties: Leica Biosystems Newcastle Ltd (Locatie A) en twee onafhankelijke laboratoria (locatie B en C) voor in totaal 192 coupes van een TMA die 30 invasieve borsttumoren en 24 HER2 Control Slides bevatten. Van de 192 gekleurde TMA-coupes waren 96 gekleurd met de HER2 Primary Antibody en 96 met de HER2 Negative Control-reagens. Alle objectglaasjes werden gekleurd met het Bond Oracle HER2 IHC System op het volledig geautomatiseerde geavanceerde BOND-kleuringsstelsel. De objectglaasjes werden geëvalueerd tijdens 8 onafhankelijke runs die binnen elk van de 3 verschillende onderzoekslocaties werden uitgevoerd met behulp van een Bond Oracle HER2 IHC System van dezelfde productiebatch. De gekleurde objectglaasjes werden op willekeurige wijze geblindeld en geëvalueerd door één ervaren observator bij Leica Biosystems, Newcastle Ltd met het doel om de reproduceerbaarheid tussen laboratoria vast te stellen.

Uit een evaluatie van de objectglaasjes uit het onderzoek naar de reproduceerbaarheid tussen laboratoria bleek dat 1477 van de 1920 (76,93%) testgegevenspunten geïnterpreteerd konden worden. 443 testgegevenspunten konden niet worden geïnterpreteerd dankzij:

- a) een inadequate prestatie van de HER2 Control in 2 van de 24 gevallen, als gevolg waarvan 2 runs/160 testgegevenspunten werden uitgesloten. Dit gebeurde één keer op locatie A en één keer op locatie B (waarbij 80 gegevenstestpunten per onderzoekslocatie werden uitgesloten).
- b) Afwijking van het testplan op locatie C, waarbij in totaal 24 slides handmatig werden tegengekleurd met hematoxyline na kleuring met het Bond Oracle HER2 IHC System. Dit resulteerde in een excessieve tegenkleuring van zowel de HER2 controleglaasjes als de TMA-testgegevenspunten, als gevolg waarvan 240 gegevenspunten werden uitgesloten.
- c) Verlies van invasieve tumor, met als gevolg de uitsluiting van 23 testgegevenspunten. Dit trad 23 keer op in locatie A als direct resultaat van het verlies van weefsel in het TMA-blok bij de productie van 192 achtereenvolgende TMA-coupes die nodig waren om dit onderzoek te voltooien.
- d) Oninterpreteerbare kleuring als gevolg van onvoldoende wassen door het volledig geautomatiseerde BOND-kleuringsstelsel, met als gevolg de uitsluiting van 20 gegevenspunten. Een evaluatie van de interpreteerbare objectglaasjes tijdens het onderzoek van de precisie tussen laboratoria gaf aan dat er variatie in kleuring plaatsvond in 79 (5,28%) van 1.477

potentiële kleuringsgebeurtenissen. Hiervan vertegenwoordigden 14 van de 1.477 (0,95%) gebeurtenissen variaties van 0 tot 1+ of 2+ tot 3+. In een 2x2 gegevensevaluaties vertegenwoordigde dit geen verandering van een klinisch positieve score in een klinisch negatieve score of omgekeerd. Pass-waarde = 99,05% (95% CI = 98,42% tot 99,46%). Van de 14 kleuringsgebeurtenissen trad 5 van de 1.477 (0,34%) op bij Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (locatie A). 8 van de 1.477 (0,54%) trad op in locatie B, en 1 van de 1.477 (0,07%) trad op in locatie C.

De resterende 65 van de 1.477 (4,40%) kleuringsgebeurtenissen wezen op een variatie van 2+ tot 1+ of 2+ tot 0 en zouden dientengevolge in een 2x2 gegevensevaluatie een verandering vertegenwoordigen van een klinisch positieve score in een klinisch negatieve score of omgekeerd. Pass-waarde = 95,6% (95% CI = 94,42% tot 96,54%). Van de 65 klinisch significante veranderingen trad 11 van de 65 (16,9%) op bij Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (locatie A). 24 van de 65 (36,9%) trad op in locatie B, en 30 van de 65 (46,1%) trad op in locatie C. Van de klinisch significante veranderingen vond er geen enkele keer een verandering van 3+ naar een negatieve score (0 of 1+) of omgekeerd plaats.

## E. Reproduceerbaarheid tussen observatoren

40 willekeurig geselecteerde weefselmonsters met invasieve borstkanker, resulterende in een gelijke verdeling van elk van de HER2 IHC-classes (resectie-monsters), werden achtereenvolgens gecoupeerd en verstrekt aan Leica Biosystems, Newcastle Ltd (locatie A), locatie B en locatie C voor kleuring en interpretatie. De coupes werden op elke locatie geblindeerd en gerandomiseerd alvorens van een score te worden voorzien. De overeenkomsten tussen observanten tussen de twee onafhankelijke klinische locaties, locatie B en locatie C, bedroeg 87,5% (95% CI = 73,3% tot 95,8%). De overeenkomst tussen locatie B en C en Leica Biosystems Newcastle, Ltd bedroeg respectievelijk 92,5% (95% CI = 79,6% tot 98,4%) en 85% (95% CI = 70,1% tot 94,29%). De analyse van de totale overeenkomst tussen de drie observatoren (A, B, C) bedroeg 82,50%.

## F. Precisie tussen instrumenten (BOND-MAX versus BOND-III)

De tests van de precisie tussen instrumenten met behulp van het Bond Oracle HER2 IHC System werden uitgevoerd op één onafhankelijke Europese onderzoekslocatie. De geteste monsters werden verkregen uit in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde volledige coupes van honderddertig acht (138) weefselmonsters met invasieve borstkanker (dikkenaaldbiopsie en resectie-monsters). De tests tussen instrumenten werden prospectief uitgevoerd binnen de onderzoekslocaties, waarbij opeenvolgende coupes werden gekleurd op de BOND-MAX- en BOND-III-platforms. Drie weefselmonsters werden als ongeschikt beschouwd doordat monsters/tumoren uit het onderzoek werden verwijderd.

Binnen elk instrument werd gebruik gemaakt van identieke partijnummers van het Bond Oracle HER2 IHC System en BOND Instrument-hulpagentia. Secties werden retrospectief gekleurd. De objectglaasjes werden op de onderzoekslocatie door één ervaren observant geïnterpreteerd om de precisie tussen instrumenten vast te stellen.

Een evaluatie van de objectglaasjes met betrekking tot de precisie tussen instrumenten wees op een 2x2 concordantie tussen positief (2+, 3+) en negatief (0, 1+) van 94,2% (130/138) met een 95% CI van 88,9 tot 97,5% en een 3x3 concordantie tussen positief, (3+), geen uitsluitel (2+) en negatief (0, 1+) van 87,0% (120/138) met een 95% CI van 80,2 tot 92,1%.

BOND-MAX		
Negatief (0/1+)	Positief (2/3+)	Totalen

<b>BOND-III</b>	<b>Negatief (0/1+)</b>	80	1	81
	<b>Positief (2/3+)</b>	7	50	57
	<b>Totalen</b>	87	51	138

Algehele concordantie (95% CI) = 94,2% (88,9 tot 97,5%)

Tabel 14. 2x2 concordantie van kleuring met Bond Oracle HER2 IHC System op het BOND-MAX- en BOND-III-platform.

		<b>BOND-MAX</b>			
		<b>Negatief (0/1+)</b>	<b>Geen uitsluitel (2+)</b>	<b>Positief (3+)</b>	<b>Totalen</b>
<b>BOND-III</b>	<b>Negatief (0/1+)</b>	80	1	0	81
	<b>Geen uitsluitel (2+)</b>	6	5	1	12
	<b>Positief (3+)</b>	1	9	35	45
	<b>Totalen</b>	87	15	36	138

Algehele concordantie (95% CI) = 87,0% (80,2 tot 92,1%)

Tabel 15. 3x3 concordantie van kleuring met Bond Oracle HER2 IHC System op het BOND-MAX- en BOND-III-platform.

Samenvattend demonstreren de gegevens die op basis van dit onderzoek werden verkregen een hoog niveau van concordantie tussen de BOND-MAX- en BOND-III-systemen van Leica Biosystems indien geëvalueerd in samenhang met het Bond Oracle HER2 IHC System.

## Probleemoplossing

<b>Probleem</b>	<b>Mogelijke oorzaak</b>	<b>Herstelactie</b>
-----------------	--------------------------	---------------------

Geen immunohistochemische kleuring	Run afgebroken voor voltooiing	Bevestig met behulp van BOND-software de aanwezigheid van eventuele rapporteerbare fouten tijdens de kleuringrun en los deze problemen op volgens de aanwijzingen van de BOND-software.
	Selectie van onjuist protocol	Zorg dat de waarde <b>*IHC Protocol H</b> is ingesteld in het veld Staining protocol in het venster Add slide.
	Onjuiste deparaffinisatie van objectglasjes	Controleer of de modus <b>*Dewax</b> is geselecteerd in het veld Preparation van het venster Add slide.
	Verkeerde bulkreagentia afgegeven	Zorg ervoor dat alle BOND-reagentia aan de juiste bulkcontainers zijn toegewezen en in de juiste posities op het instrument zijn geplaatst.
	Contaminatie van BOND Wash Solution met natriumazide	Gebruik verse BOND Wash Solution die op de juiste werkingskracht is voorbereid.
Zwakke specifieke immunohistochemische kleuring	Onjuiste verwijdering van epitooop	Zorg ervoor dat de juiste BOND Epitope Retrieval-reagentia zijn toegewezen aan de juiste bulkcontainers, en dat de BOND-software is ingesteld op het juiste protocol voor het ophalen van epitope, <b>*HIER 25 min met *ER1 (97)</b> .
	Onjuiste fixering of verwerking van proefmonster	Zorg ervoor dat er gebruik wordt gemaakt van een fixeerstof op basis van formaline en dat de verwerkingsplanningen geschikt zijn voor het monster dat wordt getest.
	Het Bond Oracle HER2 IHC System wordt gebruikt na de uiterste houdbaarheidsdatum	Zorg ervoor dat het Bond Oracle HER2 IHC System binnen de gespecificeerde houdbaarheidsperiode worden gebruikt.
Overmatige specifieke immunohistochemische kleuring	Onjuiste verwijdering van epitooop	Zorg ervoor dat de juiste BOND Epitope Retrieval-reagentia zijn toegekend aan de juiste bulkcontainers, en dat de BOND-software is ingesteld op <b>*HIER 25 min with ER1 (97)</b> .
	Variatie in fixering	Zorg ervoor dat er gebruik wordt gemaakt van een fixeerstof op basis van formaline en dat de verwerkingsplanningen geschikt zijn voor het monster dat wordt getest. Test indien mogelijk het weefselmonster opnieuw met behulp van een ander blok. Als dit niet mogelijk is, moet u de gebieden evalueren die de beste fixeringspatronen tonen in samenhang met een overeenkomstig gekleurde H&E-coupe.
<b>Probleem</b>	<b>Mogelijke oorzaak</b>	<b>Herstelactie</b>

Niet-specifieke achtergrondkleuring	Verkeerde bulkreagentia afgegeven	Zorg ervoor dat alle BOND-reagentia zijn toegewezen aan de juiste bulkcontainers en in de juiste posities op het instrument zijn geplaatst.
	Onjuiste deparaffinisatie van objectglaasjes	Zorg ervoor dat in het veld Preparation van het veld Add slide de optie <b>*Dewax</b> is geselecteerd.
	Niet-specifieke immunohistochemische kruisreactie in weefsel	Zie de beschrijving van het Bond Oracle HER2 IHC System van kruisreactiviteit bij normaal weefsel (zie tabel 13).
	Niet-specifieke immunohistochemische kruisreactie met gebieden waar sprake is van weefselnecrose	Zorg ervoor dat er gebruik wordt gemaakt van een fixeerstof en dat de verwerkingsplanningen geschikt zijn voor het monster dat wordt getest. Test indien mogelijk het weefselmonster opnieuw met behulp van een ander blok. Indien dit niet mogelijk is, moet u in samenhang met een overeenkomstig gekleurde H&E-coupe gebieden evalueren die de beste fixeringspatronen tonen.
	Drogend artifact na een voltooiing van een kleuringrun	Als objectglaasjes op een run na een nacht moeten worden geplaatst, wordt het aanbevolen om gebruik te maken van de vertraagde startfunctionaliteit van BOND. Zorg ervoor dat er gedurende deze periode een voldoende volume van gedistilleerd of gedestioniseerd water beschikbaar is voor afgifte op de objectglaasjes om ervoor te zorgen dat de objectglaasjes niet uitdrogen.
	Coupes die aan objectglaasjes zijn gehecht met behulp van stijfseladditieven	Maak gebruik van ongesteven objectglaasjes (bijv. Leica BOND Plus Slides – productcode S21.2113).
Weefsel dat is losgeraakt van een of meer patiëntglaasjes/controleglaasjes	Het gebruik van objectglaasjes van het verkeerde type of onvoldoende drainage van de coupe	Zorg ervoor dat de juiste objectglaasjes worden gebruikt voor de patiënt-/controlecoupes (bijv. Leica BOND Plus Slides – productcode S21.2113). Zorg ervoor dat objectglaasjes voldoende drainage ontvangen en zijn geïncubeerd op 12–18 uur bij 37 °C (na een nacht). Coupes die een verdere hechting vereisen kunnen een uur langer worden geïncubeerd op een temperatuur van 60 °C.

Tabel 16. Probleemoplossingsgids voor het Bond Oracle HER2 IHC System.

Als problemen met betrekking tot het Bond Oracle HER2 IHC System buiten de probleemoplossingsgids vallen (zie tabel 16), moet u contact opnemen met de lokale technische ondersteuning of distributeur van Leica Biosystems voor hulp.

## Referenties

1. Corbett IP, Henry JA, Angus B et al. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Pathology* 1990; 161:15-25.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992-1003.
3. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. at. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship with 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<sup>®</sup>) 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. Tammola, 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 $\alpha$  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. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology* 2006.

## Aanpassingen ten opzichte van vorige editie

Precisie tussen instrumenten (BOND-MAX versus BOND-III).

## Publicatiedatum

24 februari 2017

## Identificatie van symbolen

	Batchcode		Opslag		Catalogusnummer
	In vitro diagnostisch medisch apparaat		Fabrikant		Breekbaar
	Raadpleeg instructies voor gebruik		Bevat voldoende materiaal voor <n> tests		Te gebruiken voor JJJJ-MM-DD
<b>SN</b>	Serienummer				

HercepTest™ is een merk van, en wordt in licentie gegeven door DakoCytomation, Denmark A/S  
Herceptin® is een merk van Genentech, Inc. en F. Hoffmann-La Roche Ltd.