

# Bond™ Oracle™ HER2

## IHC System Instrucțiuni de utilizare

Pentru utilizare în sistemul de colorare Leica Biosystems' BOND™ avansat și complet automatizat.

Produsul cu codul TA9145 este destinat colorării a 60 de teste (150 de lame):

60 de lame de test cu HER2 Primary Antibody

60 de lame de test cu HER2 Negative Control

15 lame HER2 Control Slides cu HER2 Primary Antibody

15 controale de țesut interne pozitive cu 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

# Cuprins

<b>Utilizare prevăzută</b> .....	<b>4</b>
Pentru uz diagnostic in vitro .....	4
<b>Rezumat și explicații</b> .....	<b>4</b>
Context .....	4
Expresia oncoproteinei HER2 .....	5
Rezumat privind concordanța clinică.....	5
<b>Principiul metodei</b> .....	<b>5</b>
Componente furnizate .....	5
Instrucțiuni de utilizare.....	6
Conservare și stabilitate .....	6
Prepararea probelor .....	6
Avertismente și precauții .....	7
<b>Metodă</b> .....	<b>7</b>
A. Reactivi necesari dar nefurnizați.....	7
B. Echipamente necesare dar nefurnizate .....	7
C. Metodologie .....	8
D. Disponerea lamelor.....	8
E. Etapele metodei .....	9
<b>Controlul calității</b> .....	<b>10</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	11
Componente ale țesuturilor de control intern pozitiv – HER2 Primary Antibody .....	11
Componente ale țesuturilor de control intern negativ – HER2 Primary Antibody .....	12
Țesut de pacient – HER2 Negative Control .....	12
Țesut de pacient – HER2 Primary Antibody .....	12
Verificare analiză .....	12
Interpretarea colorației - Mamar .....	12
Interpretarea colorației - Gastric.....	13
<b>Raționamentul privind ordinea de screening a lamelor</b> .....	<b>14</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody .....	14
2. Țesut de control intern pozitiv – HER2 Primary Antibody.....	14
3. Componentă a țesuturilor de control intern negativ – HER2 Negative Control .....	14
4. Țesut de pacient – colorare utilizând HER2 Negative Control .....	15
5. Țesut de pacient – colorare utilizând HER2 Primary Antibody.....	15
<b>Limitări</b> .....	<b>15</b>
A. Limitări generale .....	15
B. Limitările specifice produsului .....	15
<b>Date privind liniile celulare</b> .....	<b>16</b>
<b>Concordanța clinică a Bond Oracle HER2 IHC System cu Dako HercepTest - Mamar</b> .....	<b>16</b>
Rezultatele de concordanță în formatul 2x2 .....	17
Rezultatele de concordanță în formatul 3x3.....	18
<b>Concordanța clinică a Bond Oracle HER2 IHC System cu PathVysion DNA HER-2 Probe Kit - Mamar</b> .....	<b>18</b>
Rezultatele de concordanță în formatul 3x2 .....	19
<b>Concordanța clinică între Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System și sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. - Gastric</b> .....	<b>20</b>

<b>Rezultate - Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System comparativ cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. - Gastric.....</b>	<b>19</b>
Rezultatele de concordanță în formatul 2x2.....	20
Rezultatele de concordanță în formatul 3x3.....	21
<b>Immunoreactivitate – Tablou normal .....</b>	<b>22</b>
<b>Studiu de reproductibilitate.....</b>	<b>23</b>
Testarea preciziei în cadrul unui ciclu și între cicluri.....	23
A. Testarea preciziei în cadrul unui ciclu .....	23
B. Testarea preciziei între cicluri.....	23
C. Reproductibilitatea între loturi .....	23
D. Reproductibilitatea între laboratoare.....	24
E. Reproductibilitatea între observatori .....	25
F. Precizia între aparate (BOND-MAX față de BOND-III).....	25
<b>Soluționarea problemelor.....</b>	<b>26</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>28</b>

## Utilizare prevăzută

### Pentru uz diagnostic in vitro

Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System este o analiză imunohistochimică (IHC) semicantitativă pentru determinarea stării oncoproteinei HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 - Receptorul 2 al factorului de creștere epidermal uman) în țesuturile de cancer mamar și adenocarcinoamele gastrice (inclusiv de joncțiune esogastrică) procesate pentru evaluare histologică. Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System este indicat ca un ajutor în evaluarea pacienților pentru care este luat în considerare tratamentul cu Herceptin® (trastuzumab) (consultați prospectul pentru Herceptin®).

Notă: Toți pacienții din studiile clinice ale Herceptin® au fost selectați utilizând o analiză imunocitochimică de investigație Clinical Trial Assay (CTA). Niciunul dintre pacienții din aceste studii nu a fost selectat folosind sistemul Bond Oracle HER2 IHC System. Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System a fost comparat cu sistemul Dako HercepTest™ pe un set independent de probe și s-a observat că se obțin rezultate concordante acceptabile, așa cum se indică în Rezumatul privind concordanța clinică. Nu a fost stabilită corelarea reală a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu rezultatele clinice.

Toți pacienții din studiile clinice Herceptin® pentru cancer gastric avansat (ToGA) au fost selectați utilizând Testul Dako Hercep. Niciunul dintre pacienții din aceste studii nu a fost selectat folosind sistemul Bond Oracle HER2 IHC System. Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System a fost comparat cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. pe un set independent de probe și s-a observat că se obțin rezultate concordante acceptabile, așa cum se indică în Rezumatul privind concordanța clinică (Cancer gastric). Nu a fost stabilită corelarea reală a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu rezultatele clinice.

## Rezumat și explicații

### Context

Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System conține anticorpul monoclonal de șoarece anti-HER2, clone CB11. Clone CB11, dezvoltat inițial de Corbett et al (1) și produs de Novocastra Laboratories Ltd (în prezent Leica Biosystems Newcastle Ltd), este direcționat asupra domeniul intern al oncoproteinei HER2.

Într-o proporție de pacienți cu cancer de sân și gastric, HER2 oncoprotein este supra-exprimată ca parte a procesului de transformare malignă și progresia tumorii (2). Stare HER2 a fost demonstrat, de asemenea, să aibă implicații importante pentru tratamentul cancerului gastric (3). Overexpression de HER2 oncoprotein găsite în celulele cancerului de san HER2 sugerează ca o tinta pentru o terapie pe bază de anticorpi, în timp ce rezultatele din studiul Toga indică în mod clar că utilizarea Herceptin în cancerul gastric, împreună cu chimioterapia este un tratament eficient care îmbunătățește supraviețuirea generală în HER2 cancer gastric pozitive (4). Herceptin este un anticorp monoclonal umanizat (5) care se leagă cu afinitate mare pentru a HER2 oncoprotein și-a arătat că inhibă proliferarea celulelor tumorale umane care exprimă în exces HER2 oncoprotein atât in vitro cât și in vivo (6-8).

Începând cu prima metodă cu imunoperoxidază raportată de Nakane și Pierce (9), au avut loc multe progrese în domeniul imunohistochimiei care au dus la o mărire a sensibilității analizei. O descoperire recentă o reprezintă utilizarea marcării polimerice. Această tehnică a fost aplicată atât anticorpilor primari cât și sistemelor de detecție imunohistochimică (10). Sistemul de detecție Compact Polymer™ utilizat de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System face parte dintr-o gamă de noi tehnologii de polimerizare controlată care au fost dezvoltate special pentru a prepararea conjugate polimerice HRP (peroxidază) - anticorp de legătură. Deoarece această tehnologie de polimerizare este utilizată în cadrul gamei de produse Oracle, problema colorării nespecifice din cauza legării biotinei endogene, care poate fi observată la sistemele de detecție cu streptavidină/biotină, este evitată.

## Expresia oncoproteinei HER2

Oncoproteina HER2 este exprimată la niveluri detectabile prin imunohistochimie în până la 20% din adenocarcinoamele din diferite zone. Între 10% și 20% din carcinoamele ductale invazive ale sânului (11) și 20% din cazurile de cancer gastric (12-14) sunt pozitive pentru HER2 oncoprotein. 90% din cazurile de carcinoame ductale in situ (DCIS) de tip comedo sunt pozitive (15), împreună cu aproape toate cazurile de boală Paget a sânului (16).

### Rezumat privind concordanța clinică

Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System a fost dezvoltat pentru a furniza o alternativă la analiza de investigație Clinical Trial Assay (CTA) utilizată în studiile clinice ale Herceptin®. Performanța sistemului Bond Oracle HER2 IHC System pentru determinarea supraexpresiei oncoproteinei HER2 a fost evaluată într-un studiu independent prin compararea rezultatelor sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu cele ale Dako HercepTest în 431 probe de tumoare mamară având originea în Statele Unite. Niciuna dintre aceste probe de tumoare nu a fost obținută de la pacienții din studiile clinice pentru Herceptin®. Rezultatele au indicat o concordanță de 92,34% pentru o analiză în format 2x2 (interval de încredere cu o probabilitate de 95% cuprins între 89,42% și 94,67%) și 86,54% pentru o analiză în format 3x3 (interval de încredere cu o probabilitate de 95% cuprins între 82,95% și 89,62%) între rezultatele de la cele două analize. Performanța sistemului Bond Oracle HER2 IHC System pentru determinarea supraexpresiei oncoproteinei HER2 în adenocarcinoamele gastrice (inclusiv de joncțiune esogastrică) a fost evaluată într-un studiu independent prin compararea rezultatelor sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu cele ale sistemului PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. pe 287 de probe de tumoare gastrică având originea în China. Niciuna dintre aceste probe de tumoare nu a fost obținută de la pacienții din studiile clinice pentru Herceptin®. Rezultatele au indicat o concordanță de 95,12% pentru o analiză în format 2x2 (pentru un interval de încredere de 95% a fost cuprinsă între 91,95% și 97,31%) și 89,90% pentru o analiză în format 3x3 (pentru interval de încredere de 95% a fost cuprinsă între 85,81% și 93,13) între rezultatele de la sistemul Bond Oracle HER2 IHC System și respectiv sistemul Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5).

### Principiul metodei

Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System conține componentele necesare pentru a efectua o procedură de colorare imunohistochimică pentru țesuturile fixate în formol și incluse în parafină. După incubarea cu HER2 Primary Antibody (clone CB11) gata de utilizare, acest sistem utilizează tehnologia Compact Polymer gata de utilizare. Transformarea enzimatică a cromogenului adăugat ulterior duce la formarea unui produs de reacție vizibil la situl antigenic. Secțiunile de țesut pot fi apoi supuse unei colorări de contrast, deshidratate, clarificate și montate. Rezultatele sunt interpretate utilizând microscopia optică. Lamele de control cu patru linii celulare de carcinom mamar uman, fixate în formol și incluse în parafină sunt furnizate pentru a valida ciclurile de colorare. Cele patru linii celulare indică expresia oncoproteinei HER2 la intensități de 0, 1+, 2+ și 3+. Intensitatea de colorare a acestor linii celulare se corelează atât cu încărcarea cu receptori ai oncoproteinei HER2 per celulă cât și cu starea de amplificare a genei HER2.

Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System (cod produs TA9145) este destinat utilizării în sistemul de colorare Leica Biosystems' BOND, avansat și complet automatizat.

### Componente furnizate

Materialele enumerate mai jos (Tabelul 1) sunt suficiente pentru a colora 150 de lame (60 de lame de test incubate cu HER2 Primary Antibody, 60 de lame de test corespunzătoare incubate cu HER2 Negative Control, 15 lame HER2 Control Slides incubate cu HER2 Primary Antibody și 15 controale de țesut interne pozitive incubate cu HER2 Primary Antibody). Numărul de teste se bazează pe utilizarea a 150 µl distribuit automat per lamă. Trusa furnizează materialele suficiente pentru maxim 15 cicluri de testare BOND individuale.

<b>HER2 Control Slides, (x15)</b>	Secțiunile din inimă, celulele de carcinom mamar uman, fixate în formol și incluse în parafină care indică expresia oncoproteinei HER2 la intensități de colorare de 0, 1+, 2+ și 3+ când acestea sunt colorate conform protocolului furnizat. Aceste secțiuni iaderă complet la mașină în necesită de tratare termică suplimentară.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 mL</b>	Conține anticor monoclonal IgG de șoarece purificat pentru afinitate, gatate de utilizare, done CB11 și ProClin™ 950 de 0,35%.
<b>HER2 Negative Control, 9 mL</b>	Conține IgG de șoarece gatate de utilizare în o concentrație echivalentă pentru HER2 Primary Antibody și ProClin™ 950 de 0,35%.
<b>Peroxide Block, 22,5 mL</b>	Conține peroxid de hidrogen 3-4%.
<b>Post Primary, 22,5 mL</b>	IgG de iepure anti-șoarece (<10 μg/ml) în ser fiziologic cutampon Tris conținând ser animal 10% (v/v) și ProClin™ 950 de 0,09%.
<b>Polymer, 22,5 mL</b>	Poli-HRP-IgG de capră anti- iepure (<25 μg/ml) în ser fiziologic cutampon Tris conținând ser animal 10% (v/v) și ProClin™ 950 de 0,09%.
<b>DAB Part 1, 2,25 mL</b>	Conține tetraclorhidrat de 3,3'-diaminobenzidină 66mM, într-o soluție de stabilizator.
<b>DAB Part B (x2), 22,5 mL</b>	Conține peroxid de hidrogen ≤0,1% (v/v).
<b>Hematoxylin, 22,5 mL</b>	Conține hematoxină <0,1%.

Tabelul 1. Componentele sistemului Bond Oracle HER2 IHC System

## Instrucțiuni de utilizare

Toți reactivii furnizați sunt preparați special pentru utilizarea cu această analiză și numerele de lot sunt specifice pentru fiecare sistem Bond Oracle HER2 IHC System. Pentru ca analiza să fie validă, nu este permisă nicio înlocuire.

## Conservare și stabilitate

A se conserva la 2–8 °C. A nu se congela. Imediat după utilizare se conservă din nou la 2–8 °C. Orice abatere de la aceste condiții va determina ca analiza să nu mai fie validă. Asigurați-vă că sistemul Bond Oracle HER2 IHC System utilizat este în interiorul termenului de valabilitate indicat. Semnele de contaminare și/sau instabilitate a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System sunt: turbiditatea soluțiilor, mirosul și prezența de precipitat. Condițiile de conservare, altele decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator.

## Prepararea probelor

Toate probele trebuie preparate pentru a conserva țesutul în vederea colorării imunohistochimice. Pentru toate probele trebuie utilizate metodele standard de procesare a țesuturilor (17).

Se recomandă ca țesuturile să fie preparate în fixatori pe bază de formol, să fie procesate sistematic și să fie incluse în parafină. De exemplu probele de rezecție trebuie incluse în blocuri de parafină cu grosimi de 3-4 mm și fixate timp de 18–24 de ore într-o soluție neutră de formol tamponat de 10%. Țesuturile trebuie apoi deshidratate într-o serie de soluții de alcool și clarificate cu xilen, urmată de impregnarea cu ceară de parafină topită, la o temperatură care să nu depășească 60 °C. Probele de țesut trebuie secționate la grosimi între 3–5 μm.

Lamele necesare pentru evaluarea oncoproteinei HER2 și verificarea tumorii trebuie preparate în același timp. Pentru a conserva antigenicitatea, secțiunile de țesut montate pe lame (Leica BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040) trebuie colorate

în decurs de 4–6 săptămâni de la secționare dacă se țin la temperatura camerei (18–24 °C). După secționare se recomandă ca lamele să fie incubate pentru 12–18 ore (peste noapte) la 37 °C. Secțiunile care necesită o adeziune suplimentară pot fi incubate la 60 °C pentru încă o oră.

În Statele Unite legea Clinical Laboratory Improvement Act (Legea privind îmbunătățirea laboratoarelor clinice) din 1988 solicită în secțiunea 42 CFR 493.1259(b) că "Laboratorul trebuie să păstreze lamele colorate pentru cel puțin zece ani de la data examinării și să păstreze blocurile de probe pentru cel puțin doi ani de la data examinării".

## **Avertismente și precauții**

*Numai pentru uz profesional.*

Unul sau mai multe componente ale produsului sunt periculoase.

În general, este interzisă utilizarea acestui produs de către persoanele cu vârsta sub 18 ani. Utilizatorii trebuie să fie atenți instruiți cu privire la metodele de lucru corecte, proprietățile periculoase ale produsului și instrucțiunile de siguranță necesare.

Simptomele de supraexpunere la ProClin™ 950, conservantul utilizat în reactivii Oracle, pot include iritarea pielii și a ochilor, a mucoaselor și a căilor respiratorii superioare. Concentrația de ProClin™ 950 în acest produs este de maximum 0,35%. Aceste soluții nu îndeplinesc criteriile OSHA (Agenția pentru Securitate și Sănătate la Locul de Muncă) privind substanțele periculoase. O fișă tehnică de securitate este disponibilă la cerere sau de la [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

Înainte și după fixare, probele și toate materialele în contact cu acestea, trebuie tratate ținând cont de posibilitatea acestora de a transmite infecții și trebuie eliminate luându-se măsurile adecvate.

Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor sau probelor cu pielea sau mucoasele. Dacă reactivii sau probele ajung în contact cu zone sensibile, clătiți cu apă din abundență. Cereți sfatul medicului. Consultați reglementările naționale, regionale sau locale privind eliminarea oricăror componente potențial toxice.

Pentru a evita riscul de intensificare a unei colorații nespecifice reduceți la minimum contaminarea microbiană a reactivilor.

## **Metodă**

### **A. Reactivi necesari dar nefurnizați**

- BOND Dewax Solution (cod produs AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (cod produs AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (cod produs AR9590)
- Solvenți standard utilizați în imunohistochimie (de ex. alcool etilic absolut și alcool etilic cu concentrații succesiv crescute)
- Xylene (sau substituenți ai xilenului)
- Medii de montare pe lamă
- Apă distilată sau demineralizată

### **B. Echipamente necesare dar nefurnizate**

- Leica Biosystems Sisteme de colorare BOND-MAX și BOND-III avansate și complet automatizate
- BOND Universal Covertiles™ (cod produs S21.2001, S21.4583 sau S21.4611)
- BOND Mixing Stations (cod produs S21.1971)
- Etuvă pentru uscare, capabilă să mențină o temperatură constantă de 60 °C
- Microscop optic (cu 4 obiective cu putere de mărire de 40x)
- Lamă (Leica BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040)

- Lamele
- BOND Slide Label & Print Ribbon (cod produs S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (cod produs CS9100)

## C. Metodologie

- Înainte de a aborda această metodologie, utilizatorii trebuie să fie instruiți în tehnicile de imunohistochimie BOND complet automatizate.
- Fiecare secțiune analizată care trebuie colorată cu HER2 Primary Antibody va necesita o secțiune identică pentru colorare cu HER2 Negative Control. Secțiunea de control negativ permite o diferențiere între colorația specifică și nespecifică la situl antigenului. Fiecare ciclu de colorare BOND trebuie să includă o lamă HER2 Control Slide. La sfârșitul protocolului de colorate, dacă liniile celulare nu indică profilurile de colorație corecte (consultați Ghidul de interpretare al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System), ciclul trebuie să fie considerat ca nevalid.

## D. Dispunerea lamelor

Pentru fiecare lamă se utilizează o lamă nouă BOND Universal Covertile (cod produs S21.2001, S21.4583 sau S21.4611). Utilizarea lamelor BOND Universal Covertiles care au fost folosite în prealabil pentru colorarea imunohistochimică sau prin hibridizare in situ nu a fost validată pentru acest test.

Dispunerea tăviței cu lame (Tabelul 2) permite obținerea unei performanțe optime cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System și obținerea tuturor celor 60 de teste.

Poziție lamă	Descriere lamă	Reactiv	Tip țesut	Pictogramă lamă
1	Cazul 1	*HER2 Negative Control	Test	
2	Cazul 2	*HER2 Negative Control	Test	
3	Cazul 3	*HER2 Negative Control	Test	
4	Cazul 4	*HER2 Negative Control	Test	
5	Cazul 1	*HER2PrimaryAntibody	Test	
6	Cazul 2	*HER2PrimaryAntibody	Test	
7	Cazul 3	*HER2PrimaryAntibody	Test	
8	Cazul 4	*HER2PrimaryAntibody	Test	
9	HER2 - Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Pozitiv	
10	Țesut de control intern	*HER2PrimaryAntibody	Pozitiv	

Tabelul 2. Modul de dispunere pentru tăvița cu lame, indicând tipul de țesut și de reactiv



## E. Etapele metodei

Urmați etapele de mai jos pentru a configura o tăviță cu lame în modul de dispunere descris în Tabelul 2. Aceste instrucțiuni trebuie citite împreună cu Manualul de utilizare pentru sistemul BOND.

1. Asigurați-vă că pe aparatul BOND recipientele pentru cantități mari și cele pentru reziduurile periculoase au o capacitate suficientă pentru a efectua ciclurile de colorare necesare.
2. Verificați dacă există suficient alcool și apă distilată sau demineralizată, suficientă soluție BOND Dewax Solution (furnizată gata de utilizare), soluție BOND Epitope Retrieval Solution 1 (furnizată gata de utilizare) și soluție BOND Wash Solution (furnizată ca soluție concentrată de 10 ori) în recipientele pentru reactivi, de mare capacitate, pentru a efectua ciclurile de colorare necesare.
3. Asigurați-vă că este montat un sistem curat BOND Mixing Station.
4. Porniți sistemul de colorare BOND avansat și complet automatizat.
5. Porniți BOND controlor legat la sistemul de colorare BOND avansat și complet automatizat.
6. Deschideți programul software pentru sistemul BOND.
7. Pentru un nou sistem Bond Oracle HER2 IHC System, scanați codul de bare al tăviței de reactivi cu cititorul de bare pentru a introduce sistemul în inventarul pentru reactivi BOND.
8. Accesați ecranul de configurare Slide (Lame) și faceți clic pe Add case (Adăugare caz).
9. Introduceți detaliile pentru primul caz. Verificați dacă volumul distribuit este setat la 150 µL și dacă protocolul de preparare este \*Dewax. Faceți clic pe OK.
10. Având cazul evidențiat în ecranul de configurare Slide (Lamă), faceți clic pe Add slide (Adăugare lamă).
11. Prima dată introduceți lamele de test pentru pacienți. Verificați dacă tipul de țesut este setat la Test tissue (Țesut de test).
12. Verificați dacă volumul distribuit este de 150 µL și dacă protocolul de preparare este \*Dewax.
13. Selectați valorile modului de colorare la Single (Unic) și Oracle (nu faceți clic pe Oracle control).
14. Selectați procesul IHC.
15. Selectați \*HER2 Negative Control din lista de markeri. Cu fila Protocols (Protocoale) se selectează implicit protocolul de colorare corect (\*IHC Protocol H) și protocolul HIER (\*HIER 25 min with ER1 (97)).
16. Faceți clic pe Add slide (Adăugare lamă). Este creată lama cu reactivul pentru control negativ.
17. Tot în dialogul Add slide (Adăugare lamă), selectați \*HER2 Primary Antibody din lista de markeri. Protocoalele implicite și toate celelalte setări rămân neschimbate.
18. Faceți clic pe Add slide (Adăugare lamă). Este creată lama de test.
19. Repetați etapele 8 - 18 până când se creează toate cazurile și toate lamele de test pentru pacient.
20. Apoi creați lama HER2 Control Slide. Adăugați-o la ultimul caz sau creați un nou caz pentru lamele de control, în funcție de procedurile standard ale laboratorului dvs.

Notă importantă: În cadrul sistemului Bond Oracle HER2 IHC System este obligatorie includerea unei lame HER2 Control Slide în fiecare ciclu (adică tăviță cu lame) pentru a valida analiza.

21. În caseta de dialog Add slide (Adăugare lamă) setați tipul de țesut la Positive tissue (Țesut pozitiv).
22. Faceți clic pe Oracle control.
23. Selectați numărul de lot al lamei HER2 Control Slide din lista Lot No (Nr. lot). Numărul de lot este înscris pe zona de etichetare a lamei.  
Notă importantă! Lama HER2 Control Slide trebuie să provină din același sistem Bond Oracle HER2 IHC System care va fi utilizat.
24. Selectați \*HER2 Primary Antibody din lista de markeri. Mențineți același volum distribuit, același mod de colorare, setările de proces și de protocol.
25. Faceți clic pe Add slide (Adăugare lamă) pentru a adăuga lama HER2 Control Slide.
26. În final adăugați o lamă cu țesut de control intern pozitiv.
27. Deselectați Oracle control.
28. Selectați \*HER2 Primary Antibody din lista de markeri. Mențineți același volum distribuit, același mod de colorare, setările de proces și de protocol. Tipul de țesut rămâne Positive tissue (Țesut pozitiv).
29. Faceți clic pe Add slide (Adăugare lamă). Aceasta finalizează procedura de creare a lamei.
30. Imprimați etichetele lamelor. Toate etichetele lamelor Oracle au imprimate literele "OC". Eticheta pentru lama HER2 Control Slide include de asemenea numărul de lot pentru sistemul Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Etichetați lamele în mod corespunzător.
32. Deschideți capacele tuturor recipientelor Bond Oracle HER2 IHC System și încărcăți tăvița cu reactivi în sistemul BOND.
33. Așezați lamele în tăvița cu lame în ordinea indicată în secțiunea D, Tabelul 2. Puneți lamelele noi.
34. Încărcați tăvița cu lame în sistemul BOND și apăsați butonul Load/Unload (Încărcare/Descărcare).
35. Confirmați că lamele au fost scanate și faceți clic pe butonul Run (Play) (Ciclu (Executare)) de pe ecranul de stare a Sistemului.
36. Verificați dacă câmpul indicator pentru tăviță afișează Proc (OK), iar numărul de lot și timpul de finalizare sunt afișați.
37. Când ciclul este finalizat, apăsați pe butonul Load/Unload (Încărcare/Descărcare) și scoateți tăvițele cu lame din sistemul BOND.
38. Îndepărtați lamelele și clătiți lamele cu apă demineralizată.
39. Deshidratați, clarificați și montați secțiunile.

## Controlul calității

Diferențele dintre metodele de fixare, procesare și includere a țesuturilor din cadrul laboratoarelor utilizatorilor pot să ducă la o variabilitate semnificativă a rezultatelor necesitând verificarea periodică a controalelor interne, suplimentar față de lamele HER2 Control Slides furnizate de Leica Biosystems' în sistemul Bond Oracle HER2 IHC System. Consultați îndrumările privind controlul calității cuprinse în College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry (Programul de certificare pentru imunohistochimie al Colegiului patologilor americani (CAP)); consultați de asemenea Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (Asigurarea calității în imunocitochimie, Ghid aprobat) al CSLI (denumit anterior NCCLS) (17) și Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (Raport special: Controlul calității în imunohistochimie) (18). Mai mult, consultați Tabelul 3 de mai jos pentru tipurile de controale de calitate imunohistochimice și scopul acestora.

Probă*	Descriere	HER2 Primary Antibody - colorație	HER2 Negative Control - colorație
HER2 Control Slide	Așa cum este furnizat în sistemul Bond Oracle HER2 IHC System.	Controlează metoda de colorare și indică validitatea performanței reactivului.	Detectia colorației de fond nespecifice
Țesut de control intern pozitiv	Țesut ce conține antigenul țintă. Controlul ideal este un țesut cu colorație slab pozitivă utilizat în scopul de a defini mici modificări ale sensibilității anticorpului primar.	Controlează toate etapele analizei. Validează prepararea țesutului și performanța colorării cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System.	
Componentă de țesut de control intern negativ	Țesuturile și celulele, presupuse a fi negative (pot fi localizate în țesutul de pacient sau componentele de țesut de control pozitiv/negativ).	Detectia reactivității încrucișate a anticorpului nespecific cu celule/ componentele celulare.	

\*Fixată și procesată similar cu proba de pacient

Tabelul 3. Controale de calitate imunohistochimice și scopul acestora

Țesuturile de control trebuie să fie probe de biopsie sau chirurgicale, fixate în formol, procesate și incluse în parafină cât de repede posibil și în același mod ca și probele de pacient. Probele trebuie manipulate în mod corespunzător pentru a păstra antigenicitatea țesutului în vederea colorării imunohistochimice. Pentru toate probele trebuie utilizate metodele standard de procesare a țesuturilor (17).

### HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Fiecare dintre lamele HER2 Control Slides furnizate conține patru linii celulare de carcinom mamar uman fixate în formol și incluse în parafină cu valori ale intensității colorației de 0, 1+, 2+ și 3+. În fiecare ciclu de analiză (adică tăviță cu lame) trebuie inclusă o lamă de control. Evaluarea corectă a lamei HER2 Control Slide furnizată de Leica Biosystems' indică validitatea testului (consultați Ghidul de interpretare al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System). Lamele HER2 Control Slides furnizate cu acest sistem validează numai performanța reactivului și nu verifică prepararea țesutului.

### Componente ale țesuturilor de control intern pozitiv – HER2 Primary Antibody

Dacă se utilizează componente de țesut de control intern pozitiv, acestea trebuie să fie probe de biopsie sau chirurgicale, fixate, procesate și incluse în parafină cât de repede posibil, în același mod ca și probele de pacient. Controalele de țesut pozitive indică faptul că țesuturile sunt preparate corect și că tehnicile de colorare sunt valide. Pentru fiecare ciclu de analiză trebuie inclusă cel puțin o componentă de control pozitiv. Secțiunile de control pozitiv trebuie să indice o colorație slab pozitivă pentru a defini mici modificări ale sensibilității anticorpului primar. Notă: Componentele cunoscute de țesut de control pozitiv trebuie utilizate numai pentru controlul performanței corecte a țesuturilor procesate împreună cu reactivii de analiză, și NU ca un ajutor în formularea unei interpretări specifice a probelor de pacient. Dacă țesuturile de control pozitiv nu reușesc să indice o colorare pozitivă corespunzătoare, rezultatele obținute de la probele de pacient trebuie să fie considerate nevalide.

Un bloc de control cu mai multe secțiuni de țesut conținând tumori cu toate cele 4 grade HER2 poate fi utilizat de asemenea în mod eficient ca material de control intern adecvat.

## Componente ale țesuturilor de control intern negativ – HER2 Primary Antibody

Dacă se utilizează componente de țesut de control intern negativ, acestea trebuie să fie probe de biopsie sau chirurgicale proaspete, fixate, procesate și incluse în parafină cât de repede posibil, în același mod ca și probele de pacient. Prin utilizarea țesutului de control, cunoscut ca fiind negativ pentru oncoproteina HER2, cu fiecare ciclu de colorare, se verifică specificitatea anticorpului primar și se indică orice colorație nespecifică de fond. Varietatea diferitelor tipuri de celule prezente în majoritatea secțiunilor de țesut oferă situri interne de control negativ (acestea trebuie verificate de utilizator). Ductele mamare normale, neasociate cu tumoarea furnizează o referință pentru validitatea analizei. Dacă are loc o colorare specifică în țesutul de control intern negativ, rezultatele pentru probele de pacient trebuie considerate nevalide.

Un bloc de control cu mai multe țesuturi reprezentând toate cele patru grade HER2 poate fi utilizat ca țesuturi de control negativ și pozitiv.

## Țesut de pacient – HER2 Negative Control

Utilizați HER2 Negative Control furnizat în loc de HER2 Primary Antibody pe o secțiune corespunzătoare pentru fiecare test de pacient pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o interpretare corectă a colorației oncoproteinei HER2 la situl antigenic.

## Țesut de pacient – HER2 Primary Antibody

Intensitatea colorației pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fond nespecifice cu HER2 Negative Control. La fel ca și la orice altă analiză imunohistochimică, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat și nu că acesta nu a fost prezent în celula/țesutul analizat. Consultați capitolele Raționamentul privind ordinea de screening a lamelor, Limitări, Evaluarea performanței și Imunoreactivitate pentru informații specifice privind imunoreactivitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System.

## Verificare analiză

Înainte de a utiliza inițială a oricărui anticorp sau sistem de colorare într-o metodă de diagnosticare, utilizatorul trebuie să verifice specificitatea anticorpului prin testarea acestuia pe o serie de țesuturi interne cu profiluri imunohistochimice pozitive sau negative cunoscute. Consultați capitolul Controlul calității așa cum s-a subliniat mai înainte și cerințele de control al calității din CAP Certification Program for Immunohistochemistry (Programului de certificare pentru imunohistochimie al Colegiului patologiilor americani) și/sau Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (Asigurarea calității în imunocitochimie, Ghid aprobat) al CSLI (denumit anterior NCCLS) (17). Aceste proceduri de control al calității trebuie repetate pentru fiecare lot nou de anticorpi sau ori de câte ori există o modificare în parametrii de analiză. Carcinoamele umane mamare ductale invazive (infiltrante) cu intensități de colorare a oncoproteinei HER2 de la 0 la 3+ și alte țesuturi negative corespunzătoare sunt adecvate pentru verificarea analizei.

## Interpretarea colorației - Mamar

Pentru determinarea expresiei oncoproteinei HER2, utilizând scala din Tabelul 4, se pot evalua numai profilul și intensitatea colorației membranei. Evaluarea lamei trebuie efectuată de către un medic patolog prin utilizarea unui microscop optic. Pentru evaluarea colorației imunohistochimice și a scorului, este adecvat un obiectiv cu putere de mărire 10x. Pentru confirmarea scorului trebuie utilizată o putere de mărire a obiectivului de 20–40x. Colorarea citoplasmei trebuie considerată ca o colorare nespecifică și nu trebuie inclusă în evaluarea intensității colorației membranei (19). Ca ajutor în diferențierea colorației de tip 0, 1+, 2+, și 3+, consultați Ghidul de interpretare al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System pentru imagini reprezentative ale intensității colorației. Trebuie evaluate numai probele de la pacienții cu carcinom mamar invaziv. În cazuri cu carcinom *in situ* și carcinom invaziv în aceeași probă, trebuie determinat scorul numai pentru componenta invazivă.

Profilul colorației imunohistochimice	Scor	Evaluare
Nu se observă nicio colorație sau colorația membranei se observă în mai puțin de 10% din celulele tumorale.	0	Negativ
Se observă o colorație slabă/abia perceptibilă a membranei în mai mult de 10% din celulele tumorale. Celulele sunt colorate numai parțial la nivelul membranei.	1+	Negativ
Se observă o colorare completă slabă spre moderată a membranei în mai mult de 10% din celulele tumorale.	2+	Neconcludent (slab pozitiv)
Se observă colorarea completă, puternică a membranei în mai mult de 10% din celulele tumorale.	3+	Foarte pozitiv

Tabelul 4. Interpretarea colorației HER2

Bond Oracle HER2 IHC System - rezultatele privind colorația cu acest sistem sunt interpretate ca negative pentru expresia oncoproteinei HER2 la scoruri ale intensității colorației de 0 și 1+, ca neconcludente (slab pozitive) la un scor de 2+ al intensității colorației, și ca puternic pozitive la un scor de 3+ a intensității colorației. Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System nu este destinat să furnizeze informații privind prognosticul bolii pentru pacienți și/sau medic și nu a fost validat în acest scop. Pentru fiecare evaluare a colorației, lamele trebuie examinate în ordinea prezentată mai jos pentru a determina validitatea ciclului de colorare și pentru a permite evaluarea semicantitativă a intensității colorației pentru probele de țesut.

### Interpretarea colorației - Gastric

Pentru determinarea expresiei oncoproteinei HER2, utilizând scala din Tabelul 5 și 6, se pot evalua numai profilul și intensitatea colorației membranei. Evaluarea lamei trebuie efectuată de către un medic patolog prin utilizarea unui microscop optic. Pentru evaluarea colorației imunohistochimice și a scorului, este adecvat un obiectiv cu putere de mărire 10x. Pentru confirmarea scorului trebuie utilizată o putere de mărire a obiectivului de 20–40x. Colorarea citoplasmei trebuie considerată ca o colorare nespecifică și nu trebuie inclusă în evaluarea intensității colorației membranei (15). Ca ajutor în diferențierea colorației de tip 0, 1+, 2+ și 3+, consultați Ghidul de interpretare gastrică al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System pentru imagini reprezentative ale intensității colorației. Trebuie evaluate numai probele de la pacienții cu adenocarcinom gastric sau adenocarcinom de joncțiune esogastrică.

	Profilul colorației imunohistochimice	Scor	Evaluare
Piese chirurgicale	Nu se observă nicio colorație sau colorația membranei se observă în mai puțin de 10% din celulele tumorale.	0	Negativ
	Se observă o colorație slabă/abia perceptibilă a membranei în mai mult de 10% din celulele tumorale. Celulele sunt colorate numai parțial la nivelul membranei.	1+	Negativ
	Se observă o colorație completă, slabă spre moderată a membranei basolaterale sau laterale în cel puțin 10% din celulele tumorale.	2+	Neconcludent (slab pozitiv)
	Se observă o colorație completă, puternică a membranei basolaterale sau laterale în mai mult de 10% din celulele tumorale.	3+	Foarte pozitiv

Tabelul 5. Interpretarea colorației HER2 în piesele chirurgicale de cancer gastric

	Profilul colorației imunohistochemice	Scor	Evaluare
Piese de biopsie	Nu se observă nicio colorație în niciuna din celulele tumorale	0	Negativ
	Se observă aglomerări de celule tumorale cu o colorația slabă/abia perceptibilă, indiferent de procentul de celule colorate	1+	Negativ
	Se observă aglomerări de celule tumorale cu o colorația completă, slabă spre moderată a membranei basolaterale sau laterale, indiferent de procentul de celule colorate	2+	Neconcludent (slab pozitiv)
	Se observă aglomerări de celule tumorale cu o colorația completă, puternică a membranei basolaterale sau laterale, indiferent de procentul de celule colorate	3+	Foarte pozitiv

Tabelul 6. Interpretarea colorației HER2 în piesele de biopsie pentru cancer gastric

Pentru interpretarea pieselor de biopsie colorate Bond Oracle HER2 IHC System se recomandă aglomerări de celule formate din cel puțin cinci celule tumorale.

## Raționamentul privind ordinea de screening a lamelor

Lamele trebuie analizate în următoarea ordine:

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

O analiză validă pentru lamele Oracle HER2 Control Slide indică următoarele:

- Prezența unei colorații maro puternice, completă a membranei celulare la linia celulară de control SK-BR-3 de intensitate 3+.
- Prezența unei colorații maro slabe spre moderate, completă a membranei celulare la linia celulară de control MDA-MB-453 de intensitate 2+.
- Prezența unei colorații maro slabe/abia perceptibile, incompletă a membranei celulare la linia celulară de control MDA-MB-175 de intensitate 1+.
- Lipsa unei colorații la linia celulară de control MDA-MB-231 de intensitate 0.

Notă importantă: O caracteristică a liniei celulare de control MDA-MB-175 de intensitate 1+ este profilul distinct de creștere prin care se formează aglomerările celulare. Aceste aglomerări dau naștere la o regiune periferică luminoasă, cu aspect de perie, de-a lungul aglomerării celulare. Această colorație cu aspect de perie va fi mai intensă decât restul membranei celulare. Profilul colorației corecte de intensitate 1+ pentru oncoproteina HER2 îl reprezintă colorația slabă/abia perceptibilă și incompletă a membranei celulare. La această linie celulară se poate observa și o colorație sub formă de puncte pentru regiune Golgi a citoplasmei.

### 2. Țesut de control intern pozitiv – HER2 Primary Antibody

Trebuie observată PREZENȚA unei colorații maro a membranei, corespunzătoare stării cunoscute a oncoproteinei HER2 din controlul pozitiv selectat.

### 3. Componentă de țesut de control intern negativ – HER2 Positive Control

Trebuie observată ABSENȚA colorării membranei. O componentă de țesut de control negativ confirmă absența detecției unei reactivități încrucișate a sistemului privind celulele/componentele celulare vizate în mod specific. Dacă are loc o colorare specifică în componența de țesut de control intern negativ, rezultatele pentru probele de pacient trebuie considerate nevalide.

#### 4. Țesut de pacient – colorare utilizând HER2 Negative Control

Prin ABSENȚA unei colorări a membranei se verifică marcarea specifică a antigenului țintă de către anticorpii primari. Alte colorații maro ce au loc în citoplasma probei tratate cu HER2 Negative Control, cum ar fi cele din țesuturile conjunctive, din leucocite, eritrocite și țesuturi necrotice, trebuie considerate colorații de fond nespecifice și trebuie luate în considerare.

#### 5. Țesut de pacient – colorare utilizând HER2 Primary Antibody

HER2 - nivelurile pentru expresia acestei oncoproteine sunt determinate de criteriile definite atât în Tabelul 4-6, cât și în Ghidul de interpretare al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System.

### Limitări

#### A. Limitări generale

Imunohistochimia este o tehnică de laborator în mai multe etape, utilizată ca ajutor în interpretarea și determinarea caracteristicilor histopatologice. Este o metodă ce necesită o instruire specializată cu privire la toate aspectele metodei (inclusiv selecția reactivilor și țesutului corespunzător, a modului de fixare și procesare corespunzătoare, a preparării corespunzătoare a lamei IHC), precum și a modului de interpretare.

Colorarea imunohistochimică a țesuturilor depinde de modul de manipulare, fixare și procesare a țesutului înainte de colorare. O fixare, congelare, decongelare, spălare, uscare, încălzire, secționare necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi sau fluide poate duce la artefacte, captarea anticorpului sau la rezultate fals negative. Rezultate necorespunzătoare pot fi obținute și din cauza variațiilor în metodele de fixare și includere sau neregularităților inerente din cadrul țesutului (21). Colorația de contrast excesivă sau incompletă poate de asemenea compromite corecta interpretare a rezultatelor.

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, în general are un aspect difuz. Colorația izolată a țesuturilor conjunctive poate fi observată de asemenea în secțiunile cu țesuturi fixate cu formol în exces. Utilizați celule intacte pentru interpretarea rezultatelor privind colorația. Celulele necrotice sau degenerate se colorează nespecific în mod frecvent (22). Rezultate fals-pozitive pot fi observate din cauza legării neimunologice a proteinelor sau din cauza produșilor de reacție a substratului. Acestea pot fi cauzate și de enzimele endogene cum ar fi pseudoperoxidaza (la eritrocite) sau peroxidaza endogenă (citocromul C), în funcție de tipul de colorație imunohistochimică utilizat.

Țesuturile de la pacienți infectați cu virusul hepatitei B și care conțin antigenul de suprafață al Hepatitei B (AgHBs) pot să prezinte o colorație nespecifică cu peroxidaza din hrean (23).

Colorații imunohistochimice neprevăzute sau variațiile în colorație, pot fi rezultatul unei modificări în nivelurile de expresie a genelor de codificare și a antigenelor. Orice modificări în profilurile de colorație prevăzute trebuie interpretate în asociere cu alte investigații de diagnosticare.

Interpretarea colorației imunohistochimice trebuie completată cu studii morfologice și cu utilizarea unui material de control corespunzător și trebuie evaluată de către un medic patolog calificat în contextul antecedentelor clinice ale pacientului și a oricăror alte teste de diagnosticare.

Performanța analizei (adică evaluarea adecvării atât a controalelor pozitive, cât și a celor negative) și interpretarea oricărei colorații imunohistochimice sau absența acesteia poate fi efectuată într-un laborator acreditat/autorizat în mod corespunzător, sub supravegherea unui medic patolog calificat corespunzător și experimentat, care este responsabil de evaluarea generală a analizei imunohistochimice și a interpretării acesteia.

#### B. Limitările specifice produsului

Acest produs nu este destinat utilizării în citometria de flux. Caracteristicile de performanță nu au fost determinate pentru citometria de flux.

Rezultatele fals negative pot fi observate ca rezultat al degradării antigenelor din secțiunea de țesut. Lamele necesare pentru evaluarea oncoproteinei HER2 și verificarea tumorii trebuie preparate în același timp. Pentru a conserva antigenicitatea, secțiunile de țesut aplicate pe lame (Leica BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040) trebuie colorate în decurs de 4–6 săptămâni de la secționare dacă se

în la temperatura camerei (18–24 °C). După secționare, se recomandă incubarea lamelor timp de 12–18 ore la 37 °C. Secțiunile care necesită o adeziune suplimentară pot fi incubate la 60 °C pentru încă o oră.

Se va observa o variație naturală minimă a profilului imunohistochimic între loturile de creștere ale liniilor celulare utilizate în cadrul sistemului Bond Oracle HER2 IHC System. Aceste variații naturale se încadrează bine în limitele tolerate acceptate ale unei entități biologice și nu afectează interpretarea sau performanța sistemului.

Caracterizarea liniilor celulare utilizând atât citometria de flux cât și hibridizarea in situ așa cum se prezintă în Tabelul 7, este de asemenea expusă la variația biologică naturală. Variația tehnică și de interpretare a liniilor celulare de control evaluate prin hibridizarea fluorescență in situ este de asemenea raportată (24).

La evaluarea lamelor HER2 Control Slides trebuie să se ia în considerare toate datele de expirare relevante. Conservați sistemul Bond Oracle HER2 IHC System la 2–8 °C. A nu se congela. Imediat după utilizare se conservă din nou la 2–8 °C. Orice abatere de la aceste condiții va determina ca analiza să nu mai fie validă.

Nu înlocuiți reactivii sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu nicio altă componentă furnizată de Leica Biosystems sau de alți producători. Procedând astfel, analiza nu va fi validă. Este esențial ca toate etapele evidențiate în secțiunile C până la E (Metodă) să fie efectuate în ordinea prescrisă. Orice abatere de la aceste condiții va determina ca analiza să nu mai fie validă. Este foarte important să fie utilizate țesuturi fixate numai în fixatori pe bază de formol. Utilizarea oricăror alte tipuri de fixatori va invalida analiza.

Țesuturile secționate la grosimi cu valori în afara domeniului recomandat nu au fost validate. Utilizarea oricăror alte grosimi ale secțiunilor poate invalida analiza.

## Date privind liniile celulare

Linii celulare	Profilul pentru sistemul BOND Oracle HER2 IHC System	HER2Încărcarea cu receptoriper celulă*	HER2 Starea de amplificare a genei <sup>†</sup>	
			HER2Numărcopie	HER2:Chr17-Raport de gene
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

\*analiza încărcării cu receptori HER2 este efectuată prin citometria de flux. Starea de amplificare a genei <sup>†</sup> HER2 așa cum este evaluată prin sonda dublă (HER2:Cromozom 17) FISH.

Tabelul 7. Profilul lamei HER2 Control Slide

## Concordanța clinică a Bond Oracle HER2 IHC System cu Dako HercepTest - Mamar

Prima parte a studiului a examinat adecvabilitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System pentru utilizarea acestuia ca ajutor în determinarea tratamentului pentru terapia cu Herceptin® (trastuzumab). Studiul a fost conceput pentru a examina concordanța între sistemul Bond Oracle HER2 IHC System și Dako HercepTest, considerat ca "standardul de aur" pentru această analiză. Criteriul de acceptare a fost definit ca mai mare decât 75% din concordanța totală între cele două teste cu un interval de încredere (CI) cu o probabilitate de 95%.

Studiul a fost desfășurat ca o evaluare oarbă, în două centre din Statele Unite. Fiecare centru de investigație a fost aprovizionat cu probe de carcinom mamar fixate în formol și incluse în parafină, de stare cunoscută a oncoproteinei HER2. Cazurile au fost selectate în ordine



succesivă inversă din arhiva clinică, reprezentând fluxul succesiv de cazuri dintr-un departament histopatologic pentru testare clinică și au fost testate independent de alte prognosticuri și/sau factori de predicție, fără a fi introduse erori în cadrul cohorței. Cohortele de 160 de persoane și 292 de probe au fost testate în centrul 1 și respectiv centrul 2. Fiecare cohortă a avut o reprezentare egală de cazuri concluyente/pozitive (2+, 3+) și negative (0, 1+), pe baza unor scoruri HER2 IHC atribuite anterior, ducând la un total al populației de studiu de 452 de probe. Douăsprezece probe au fost considerate necorespunzătoare din cauza lipsei unui carcinom invaziv suficient și au fost eliminate din studiu. Alte nouă probe n-au putut fi evaluate ca rezultat al desprinderii țesutului de pe suprafața lamei, ducând la o populație de studiu finală de 431 de probe.

Toate cazurile au fost colorate cu HercepTest în conformitate cu instrucțiunile producătorului specificate în prospect. Secțiunile succesive de la fiecare caz au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare Leica Biosystems' BOND avansat și complet automatizat. Toate cazurile au fost separate de informațiile de identificare unice ale pacienților și au fost însoțite de date clinice referitoare la mărirea, stadiul și gradul tumorii și de starea receptorilor de estrogen.

Toate lamele colorate au fost mascate și a fost evaluată intensitatea acestora într-un mod aleator de către observatori instruiți, în două centre. Pentru analiza de concordanță în formatul 2x2, scorurile au fost interpretate ca negative dacă intensitatea colorației a fost 0 sau 1+ și pozitive dacă scorurile au fost 2+ sau 3+. Pentru analiza de concordanță în formatul 3x3, scorurile au fost interpretate ca negative dacă intensitatea colorației a fost 0 sau 1+, neconcluyente pentru scorurile 2+ și pozitive pentru scorurile 3+. Datele au fost analizate apoi pentru concordanța colorațiilor pozitive și pentru concordanța colorațiilor negative.

## Rezultatele de concordanță în formatul 2x2

În această analiză primară rezultatele analizelor din cele teste (Bond Oracle HER2 IHC System și Dako HercepTest) sunt clasificate ca negative (0,1+) sau pozitive (2+, 3+). Frecvențele celor patru combinații posibile sunt prezentate în formatul de tabel 2x2 (a se vedea Tabelul 8). Apoi rata de concordanță totală bazată pe acest tabel de format 2x2 a fost calculată însoțită de un interval de încredere exact cu o probabilitate de 95% (bazat pe distribuția binomială).

Ipoza de nul ( $H_0$ ), pe baza căreia este stabilit criteriul de succes, este că, concordanța nu este mai mare de 75%.

Concordanța observată a celor 431 de probe pentru cele două teste într-o analiză 2x2 au arătat o concordanță de 92,34% (398/431) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 89,42% și 94,67%. Aceste date sprijină respingerea ipotezei de nul ( $H_0$ ) pe baza căreia concordanța observată nu a fost mai mare de 75% cu o valoare  $p < 0,0001$ .

Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System de a identifica în mod corect cazurile pozitive de HercepTest (procentul de probe evaluate ca pozitive atât de către Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de către HercepTest raportat la toate cazurile HercepTest pozitive) a fost de 84,87% (129/152) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 78,17% și 90,16%. Concordanța negativă în procente (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica în mod corect cazurile negative de HercepTest (procentul de probe evaluate ca negative atât de către Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de către HercepTest raportat la toate cazurile HercepTest negative) a fost de 96,42% (269/279) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 93,51% și 98,27%.

		HercepTest		
		Negativ	Pozitiv	Totals
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativ	269	23	292
	Pozitiv	10	129	139
	Totals	279	152	431

Concordanță în formatul 2x2 (CI cu o probabilitate de 95%) = 92,34% (între 89,42 și 94,67%);  $p < 0,0001$

Tabelul 8. Concordanța în formatul 2x2 a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu HercepTest

### Rezultatele de concordanță în formatul 3x3

Datele au fost grupate în negative (0 sau 1+), neconcludente (2+) sau pozitive (3+) pentru analiza 3x3 și au arătat o concordanță de 86,54% (373/431) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 82,95% și 89,62%. Astfel, ipoteza de nul ( $H_0$ ) pe baza căreia concordanța observată nu a fost mai mare de 75% a fost respinsă cu o valoare  $p < 0,0001$ .

Concordanța pozitivă în procente pentru valoarea de 3+ (procentul de probe evaluate ca pozitive 3+ atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de către HercepTest raportat la toate cazurile HercepTest pozitive 3+) din acest studiu a fost de 73,33% (66/90) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 62,97% și 82,11%. Concordanța negativă în procente a fost de 96,42% (269/279) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 93,51% și 98,27%. A se vedea Tabelul 9.

		HercepTest			
		Negativ(0sau1+)	2+	3+	Totals
BondOracleHER2 IHC System	Negativ(0sau1+)	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	Totals	279	62	90	431

Concordanță în formatul de 3x3 (CI cu o probabilitate de 95%) = 86,54% (între 82,95 și 89,62%);  $p < 0,0001$

Tabelul 9. Concordanța în formatul 3x3 a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System cu HercepTest

În concluzie, datele obținute în acest studiu arată că sistemul Bond Oracle HER2 IHC System poate fi utilizat pentru a asista în determinarea tratamentului pentru terapia cu Herceptin® (trastuzumab), pe baza concordanței sale ridicate cu HercepTest.

### Concordanța clinică a Bond Oracle HER2 IHC System cu PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mamar

Partea a 2-a a studiului a fost concepută pentru a examina concordanța dintre sistemul Bond Oracle HER2 IHC System și Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit considerat ca "standardul de aur" pentru evaluarea genelor prin testul reflex utilizat împreună cu imunohistochimie HER2.

Acest studiu s-a desfășurat în cadrul aceluiași centru de investigație și s-a utilizat aceeași cohortă de studiu ca în Partea 1. Toate cazurile au fost supuse colorării cu Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit în conformitate cu instrucțiunile producătorului specificate în prospect. Secțiunile succesive de la fiecare caz au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem BOND avansat și complet automatizat (din Partea 1 a studiului clinic). Din cele 431 de cazuri supuse colorării, nu au fost obținute colorații în trei cazuri datorită hibridizării insuficiente a sondei ducând la o cohortă totală de 428 de cazuri.

Pentru toate lamele colorate s-a evaluat intensitatea colorației de către observatori instruiți, la cele două centre de investigație. Pentru analiza de concordanță în formatul 3x2, scorurile au fost interpretate ca negative dacă raportul de amplificare a genelor HER2/CEP17 a fost mai mic de ( $<$ ) 2,0 și pozitive dacă a fost mai mare sau egal cu ( $>$ ) 2,0 după o numărare a 20 de celule tumorale.

## Rezultatele de concordanță în formatul 3x2

Concordanța observată a celor 428 de probe pentru cele două teste într-o analiză 3x2 au arătat o concordanță de 87,6% (375/428) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 84% și 90%. Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System de a identifica corect cazurile pozitive PathVysion (procentul de probe evaluate ca pozitive atât de sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de PathVysion raportat la toate cazurile pozitive PathVysion) a fost de 93,8% (61+30/97) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 86,8% și 97,4%.

Concordanța negativă în procente (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica în mod corect cazurile negative PathVysion (procentul de probe evaluate ca negative atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de PathVysion raportat la toate cazurile negative PathVysion) a fost de 85,8% (284/331) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 81,6% și 89,2%. A se vedea Tabelul 10.

		PathVysion HER2 DNA Probe Kit		
		Negativ	Pozitiv	Totals
BOND Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	Totals	331	97	428

Concordanța generală (CI cu o probabilitate de 95%) = 87,6% (între 84 și 90%)

*Tabelul 10. Concordanța în formatul 3x2 a colorării cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System față de PathVysion HER-2*

## Concordanța clinică între sistemul Bond Oracle HER2 IHC System comparativ cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. - Gastric

Scopul Părții a 3-a a studiului a fost obținerea de date din piesele de rezecție de cancer gastric în stadiu avansat, fixate în formol și incluse în parafină, pentru a examina concordanța dintre sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare BOND avansat și complet automatizat, și sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. Criteriul de acceptare a fost definit ca mai mare decât 75 % din concordanța totală între cele două teste.

Pentru analiza de concordanță în formatul 2x2, scorurile au fost interpretate ca negative dacă intensitatea colorației a fost 0 sau 1+ și pozitive dacă scorurile au fost 2+ sau 3+. Pentru analiza de concordanță în formatul 3x3, scorurile au fost interpretate ca negative dacă intensitatea colorației a fost 0 sau 1+, neconcludente pentru scorurile 2+ și pozitive pentru scorurile 3+. Datele au fost analizate apoi pentru concordanța colorațiilor pozitive și pentru concordanța colorațiilor negative.

## Rezultate - Sistemul Bond Oracle HER2 IHC System comparativ cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. - Gastric

### Rezultatele de concordanță în formatul 2x2

Determinarea concordanței între sistemul Bond Oracle HER2 IHC System complet automatizat, utilizând sistemul de colorare BOND avansat și complet automatizat, și sistemul Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) a fost desfășurată pe 287 de probe de țesut.

Concordanța observată între cele două teste într-o analiză 2x2 a fost de 95,12 % (273/287), pentru un CI de 95 % la valori cuprinse între 91,95 % și 97,31 %. Aceste date sprijină respingerea ipotezei de nul ( $H_0$ ) pe baza căreia concordanța observată nu a fost mai mare de 75% cu o valoare  $p < 0,0001$ . Concordanța pozitivă în procente (sensibilitatea) sau capacitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System de a identifica corect probele pozitive de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentul de probe evaluate pozitive atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System, cât și de către Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) raportat la toate probele pozitive Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) a fost de 90,79 % (138/152), pentru un CI de 95 % la valori cuprinse între 85,03 % și 94,87 %. Concordanța negativă în procente (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica în mod corect probele negative de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentul de probe evaluate ca negative atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de către Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) raportat la toate probele negative de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) a fost de 100 % (135/135), pentru un CI de 95 % la valori cuprinse între 97,30 % și 100 % (consultați Tabelul 11).

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

Concordanța totală (CI de 95 %) = 95,12 % (91,95 %-97,31 %)

Tabelul 11. Concordanța în formatul 2x2 a sistemului de colorare Bond Oracle HER2 IHC System comparativ cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. pe țesut gastric.

## Rezultatele de concordanță în formatul 3x3

Concordanța observată între cele două teste într-o analiză 3x3 a fost de 89,90 % (258/287), pentru un CI de 95 % la valori cuprinse între 85,81 % și 93,13 %. Astfel, ipoteza de nul ( $H_0$ ) pe baza căreia concordanța observată nu a fost mai mare de 75% a fost respinsă cu o valoare  $p < 0,0001$ . Concordanța pozitivă în procente pentru 3+ sau capacitatea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System de a identifica în mod corect probele pozitive de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentul de probe evaluate ca pozitive 3+ atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System, cât și de către sistemul Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) raportat la toate probele pozitive 3+ Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) în acest studiu a fost de 85,94 % (110/128), pentru un CI de 95 % CI la valori cuprinse între 78,69 % și 91,45 %. Concordanța negativă în procente (specificitatea) sau capacitatea testului de a identifica în mod corect probele negative de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (procentul de probe evaluate ca negative atât de către sistemul Bond Oracle HER2 IHC System cât și de către Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) raportat la toate probele negative de Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) a fost de 100 % (135/135), pentru un CI de 95 % CI la valori cuprinse între 97,30 % și 100 %. Consultați Tabelul 12.

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

Concordanța totală (CI de 95 %) = 89,90 % (85,81 %-93,13 %)

*Tabelul 12. Concordanța în formatul 3x3 a sistemului de colorare Bond Oracle HER2 IHC System comparativ cu sistemul PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody al Ventana Medical Systems Inc. pe țesut gastric.*

## Immunoreactivitate – Tablou normal

Tip normal de țesut	Profilul colorației	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Suprarenal	Negativ	Negativ
Cerebral, cerebelos	Negativ	Negativ
Cerebral, cerebelos	Negativ	Negativ
Mamar	Negativ	Negativ
Medular	Negativ	Negativ
Colonic	Negativ	Negativ
Esofagian	Negativ	Negativ
Ocular	Negativ	Negativ
Hipofizar	Colorație citoplasmică moderată observată în celulele hipofizare (1/3)	Negativ
Renal	Negativ	Negativ
Laringian	Negativ	Negativ
Hepatic	Negativ	Negativ
Pulmonar	Negativ	Negativ
Mezotelial	Negativ	Negativ
Ovarian	Negativ	Negativ
Pancreatic	Negativ	Negativ
Paratiroidal	Negativ	Negativ
Nervos periferic	Negativ	Negativ
Prostatic	Negativ	Negativ
Glandular salivar	Negativ	Negativ
Cutanat	Negativ	Negativ
Intestinal subțire	Negativ	Negativ
Splinal	Negativ	Negativ
Stomacal	Colorare citoplasmică slabă observată în glandele gastrice (2/3)	Negativ
Muscular striat	Negativ	Negativ
Testicular	Negativ	Negativ
Timic	Negativ	Negativ
Tiroidal	Negativ	Negativ
Tonsilar	Negativ	Negativ
Cervical uterin	Negativ	Negativ
Uterin	Negativ	Negativ

Tabloul 13 Panou normal de colorare

## Studiu de reproductibilitate

### Testarea preciziei în cadrul unui ciclu și între cicluri

Testarea preciziei a fost efectuată la compania Leica Biosystems, Newcastle Ltd. Țesutul utilizat a fost o micromatrice de țesuturi (TMA) de mai multe tipuri fixate în formol, incluse în parafină, livrate de Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea), conținând 20 de carote de țesut de carcinom mamar invaziv cu grosimi de 4 mm. Cele 20 de cazuri au fost selectate pe baza unor scoruri HER2 atribuite anterior. Pe această bază, au fost incluse 5x cazuri de HER2 3+, 5x cazuri de HER2 2+, 5x cazuri de HER2 1+ și 5x cazuri de HER2 0.

#### A. Testarea preciziei în cadrul unui ciclu

Testarea preciziei în cadrul unui ciclu a sistemelor Bond Oracle HER2 IHC System a fost evaluată pe un total de 40 de secțiuni consecutive dintr-o micromatrice TMA conținând 20 de tumori mamare invazive și 40 de lame HER2 Control Slides. Toate lamele au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare BOND avansat și complet automatizat. Secțiunile au fost colorate în timpul unei perioade continue utilizând un sistem Bond Oracle HER2 IHC System din același lot de fabricație. A fost ștearsă identitatea secțiunilor colorate și acestea au fost evaluate în mod aleator de către un singur observator experimentat pentru a determina precizia în cadrul ciclului de analiză.

O evaluare a lamelor pentru investigația din cadrul ciclului a indicat că pot fi interpretate 733/800 (91,63%) din punctele de date ale analizei. 40 de puncte de date au fost excluse datorită prezenței numai a DCIS (carcinom ductal in-situ), și alte 27 de puncte de date nu au putut fi interpretate din cauza pierderii carcinomului invaziv (specific pentru 3 carote de țesut). Variația în colorație a avut loc în 61 (8,32%) din totalul de 733 de evenimente de colorare. În 37 de ocazii, a fost observată variația intensității de la 3+ la 2+ (n = 20) și de la 1+ la 0 (n = 17), astfel încât acestea nu reprezintă modificări de la clinic pozitiv la clinic negativ sau vice versa într-o evaluare de date în format 2x2. Cele 24 (3,27%) de situații rămase au reprezentat modificări de la clinic negativ (0 sau 1+) la clinic pozitiv (2+ sau 3+). Valoare de reușită = 96,7% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 95,15% și 97,81%).

#### B. Testarea preciziei între cicluri

Testarea preciziei între cicluri a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System a fost evaluată pe un total de 24 de secțiuni succesive dintr-o micromatrice TMA conținând 20 de tumori mamare invazive și 24 de lame HER2 Control Slides. Toate lamele au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare BOND avansat și complet automatizat. Lamele au fost evaluate în cadrul a 8 cicluri independente, efectuate în același laborator, în trei momente de timp separate utilizând sistemul Bond Oracle HER2 IHC System din același lot de fabricație. A fost ștearsă identitatea secțiunilor și acestea au fost evaluate în mod aleator de către un singur observator experimentat pentru a determina precizia între ciclurile de analiză.

O evaluare a lamelor între cicluri a indicat că pot fi interpretate 456/480 (95,00%) din punctele de date ale analizei. 24 de puncte de date nu au putut fi interpretate datorită pierderii tumorii invazive (specifice pentru 5 carote de țesut). Variația în colorație a avut loc în 42 (9,21%) din totalul de 456 de puncte de date. În 30 de situații, a fost observată variația de la 3+ la 2+ (n = 10) și de la 1+ la 0 (n = 20), astfel încât acestea nu reprezintă modificări de la clinic pozitiv la clinic negativ sau vice versa într-o evaluare de date în format 2x2. Cele 12 (2,63%) situații rămase au reprezentat modificări de la clinic negativ (0 sau 1+) la clinic pozitiv (2+ sau 3+). Valoare de reușită = 97,37% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 95,90% și 98,77%).

#### C. Reproducibilitatea între loturi

Pentru a determina reproductibilitatea între loturi, au fost produse 3 loturi de sisteme Bond Oracle HER2 IHC System în conformitate cu GMP (buna practică de fabricație) în 3 ocazii diferite și evaluate pe 24 de secțiuni de carcinom mamar (24 de puncte de date pentru analiză) luate din patru blocuri diferite de țesuturi fixate în formol și incluse în parafină (reprezentând intensități ale colorației pentru HER2 de 0, 1+, 2+ și 3+) și trei lame HER2 Control Slides (12 puncte de

date de control). Au fost efectuate trei cicluri independente în cadrul aceluiași laborator în trei momente de timp separate, fiecare utilizând un lot de fabricație diferit al sistemului Bond Oracle HER2 IHC System. Toate lamele au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare BOND, avansat și complet automatizat. Secțiunile colorate au fost mascate și evaluate în mod aleator de către un singur observator instruit pentru a determina reproductibilitatea între loturi.

O evaluare a lamelor (pentru analize și controale) din investigațiile pentru loturi au indicat că pot fi interpretate 36/36 puncte de date. Nu au avut loc variații de culoare în cele 36 de puncte de date între cele trei loturi de fabricație diferite ale sistemului BOND Oracle HER2 IHC System. Colorația cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System este concordantă în cadrul loturilor de fabricație.

#### D. Reproducibilitatea între laboratoare

Studiul reproductibilității între laboratoare a sistemului Bond Oracle HER2 IHC System a fost evaluată în 3 centre, Leica Biosystems Newcastle Ltd (Centrul A) și două laboratoare independente (Centrele B și C) pe un total de 192 de secțiuni dintr-o micromatrice TMA incluzând 20 de carcinoame mamare invazive și 24 de lame HER2 Control Slides. Din cele 192 de secțiuni TMA colorate, 96 au fost colorate cu HER2 Primary Antibody și 96 cu reactivul HER2 Negative Control. Toate lamele au fost colorate cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe un sistem de colorare BOND avansat și complet automatizat. Lamele au fost evaluate în cadrul a 8 cicluri de analiză independente, efectuate în fiecare din cele 3 centre de investigație diferite utilizând sistemul Bond Oracle HER2 IHC System din același lot de fabricație. A fost ștearsă identitatea secțiunilor colorate și acestea au fost evaluate în mod aleator de către un singur observator experimental la Leica Biosystems, Newcastle Ltd pentru a determina reproductibilitatea între laboratoare.

O evaluare a lamelor din investigația privind reproductibilitatea între laboratoare, a indicat că pot fi interpretate 1477/1920 (76,93%) din punctele de date ale analizei. 443 de puncte de date ale analizei nu pot fi interpretate din cauza:

- a) Performanței necorespunzătoare a lamei HER2 Control slide în 2/24 ocazii ceea ce a dus la eliminarea a 2 cicluri/160 de puncte de date ale analizei. Acest eveniment a avut loc o dată la Centrul A și o dată la Centrul B (au fost eliminate câte 80 de puncte de date la fiecare centru de investigație).
- b) Abaterii de la planul de analiză la centrul C, unde un total de 24 de lame au fost supuse colorației de contrast manuale cu hematoxină după colorarea cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System. Aceasta a dus la o colorare de contrast în exces atât a lamelor HER2 control slides cât și a punctelor de date ale analizei TMA și la o eliminare a 240 de puncte de date.
- c) Pierderii tumorii invazive ce a dus la eliminarea a 23 de puncte de date ale analizei. Acest eveniment a avut loc în 23 de situații la centrul A și a fost rezultatul direct al pierderii de țesut în blocul TMA la producerea a 192 de secțiuni succesive TMA necesare pentru efectuarea acestei investigații.
- d) Colorării neinterpretabile din cauza spălării necorespunzătoare de către sistemul de colorare BOND avansat și complet automatizat ceea ce a dus la eliminarea a 20 de puncte de date.

O evaluare a lamelor interpretabile pentru studiul preciziei între laboratoare a indicat că variația în colorație a avut loc în 79 (5,28%) dintr-un total de 1477 evenimente de colorare posibile. Dintre acestea, 14/1477 (0,95%) situații au reprezentat variații de la 0 la 1+ sau de la 2+ la 3+ și astfel nu au reprezentat modificări din clinic pozitiv în clinic negativ sau vice versa în evaluarea datelor în format 2x2. Valoare de reușită = 99,05% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 98,42% și 99,46%). Din cele 14 evenimente de colorare, 5/1477 (0,34%) evenimente de colorare au avut loc la Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Centrul A), 8/1477 (0,54%) au avut loc la Centrul B și 1/1477 (0,07%) au avut loc la Centrul C.

Cele 65/1477 evenimente de colorare rămase (4,40%) au reprezentat variații de la 2+ la 1+ sau de la 2+ la 0 și astfel nu au reprezentat modificări din clinic pozitiv în clinic negativ sau vice versa în evaluarea datelor în format 2x2. Valoare de reușită = 95,6% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 94,42% și 96,54%). Din cele 65 de modificări semnificative clinic, 11/65 (16,9%) au avut loc la Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Centrul A), 24/65 (36,9%) au avut loc la Centrul B și 30/65 (46,1%) au avut loc la Centrul C. În cadrul modificărilor



semnificative clinic, în nicio situație nu a avut loc o modificare de la 3+ la negativ (0 sau 1+) ori vice versa.

## E. Reproductibilitatea între observatori

40 de cazuri de carcinoame mamare invazive selectate aleator, asigurând o distribuție egală a fiecărui grad HER2 IHC (probe de rezeecție) au fost secționare succesiv și oferite companiei Leica Biosystems, Newcastle Ltd (Centrul A), Centrului B și Centrului C pentru colorare și interpretare. A fost ștersă identitatea secțiunilor și acestea au fost distribuite aleator la fiecare centru înainte de evaluarea intensității colorației. Concordanța între observatorii din cele două centre clinice independente, Centrul B și Centrul C a fost de 87,5% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 73,3% și 95,8%). Concordanța între Centrul B, Centrul C și Leica Biosystems Newcastle, Ltd a fost de 92,5% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 79,6% și 98,4%) și respectiv 85% (CI cu o probabilitate de 95% = cuprins între 70,1% și 94,29%). Analiza concordanței totale între cei trei observatori (A, B, C) este de 82,50%.

## F. Precizia între aparate (BOND-MAX față de BOND-III)

Studiul preciziei între aparate utilizând sistemul Bond Oracle HER2 IHC System a fost efectuat într-un singur centru independent de investigație european. Probele testate au fost obținute din secțiuni întregi fixate în formol și incluse în parafină din o sută treizeci opt de cazuri de carcinom mamar invaziv (probe obținute prin biopsie cu trocar sau prin rezeecție). Testarea între aparate a fost efectuată în mod prospectiv în cadrul centrului de investigație, prin colorarea secțiunilor succesive de pe platformele BOND-MAX și BOND-III. Trei cazuri au fost considerate ca necorespunzătoare din cauza disponibilității probei/tumorii și au fost eliminate din studiu.

Pentru fiecare aparat au fost utilizate numere de lot identice ale sistemului Bond Oracle HER2 IHC System și ale reactivilor auxiliari pentru aparatul BOND. Secțiunile au fost colorate retroactiv. Lamele au fost interpretate la centrul de investigație de către un singur observator experimentat pentru a determina precizia între aparate.

O evaluare a lamelor pentru precizia între aparate a arătat o concordanță în formatul 2x2 între valorile pozitive (2+, 3+) și negative (0, 1+) de 94,2% (130/138) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 88,9 și 97,5% și o concordanță în formatul 3x3 între valorile pozitive (3+), neconcludente (2+) și negative (0, 1+) de 87,0% (120/138) cu un CI cu o probabilitate de 95% cuprins între 80,2 și 92,1%.

		BOND-MAX		
		Negativ (0/1+)	Pozitiv (2/3+)	Totals
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	81
	Pozitiv (2/3+)	7	50	57
	Totals	87	51	138

Concordanța totală (CI cu o probabilitate de 95%) = 94,2% (între 88,9 și 97,5%)

Tabelul 14. Concordanța în formatul 2x2 a colorării cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe platformele BOND-MAX față de BOND-III.

		BOND-MAX			
		Negativ (0/1+)	Neconcludent(2+)	Pozitiv (3+)	Totals
BOND-III	Negativ (0/1+)	80	1	0	81
	Neconcludent(2+)	6	5	1	12
	Pozitiv (3+)	1	9	35	45
	Totals	87	15	36	138

Concordanța totală (CI cu o probabilitate de 95%) = 87,0% (între 80,2 și 92,1%)

Tabelul 15. Concordanța în formatul 3x3 a colorării cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System pe platformele BOND-MAX față de BOND-III.

În concluzie, datele obținute în acest studiu demonstrează un înalt nivel de concordanță între sistemele Leica Biosystems' BOND-MAX și BOND-III evaluate utilizând sistemul Bond Oracle HER2 IHC System.

## Soluționarea problemelor

Problemă	Cauză probabilă	Acțiune de remediere
Nu există colorație imunohistochimică	Ciclul oprit înainte de a fi finalizat	Cu ajutorul programului software BOND, confirmați prezența oricăror erori raportabile pe parcursul ciclului de colorare și abordați-le așa cum vă îndrumă acest program.
	Selectarea incorectă a protocolului	Asigurați protocolul implicit corect la *IHC Protocol H în câmpul de protocol al colorării din caseta de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Deparafinizare necorespunzătoare a lamelor	Verificați dacă este selectat modul *Dewax în câmpul Preparation (Preparare) al casetei de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Dozarea neadecvată a reactivilor stoc	Verificați dacă toți reactivii BOND au fost introduși în recipientele de mare capacitate corespunzătoare și au fost așezați în pozițiile corecte în aparat.
	Contaminarea soluției BOND Wash Solution cu azidă de sodiu	Utilizați soluție proaspătă BOND Wash Solution preparată la concentrația de lucru corectă.
Colorare imunochimică specifică slabă	Recuperarea necorespunzătoare a epitopului	Asigurați-vă că reactivii BOND Epitope Retrieval au fost alocați recipientelor de mare capacitate corespunzătoare și că programul BOND este setat implicit la protocolul corespunzător de recuperare a epitopului *HIER 25 min with *ER1 (97).
	Fixarea sau procesarea necorespunzătoare a probelor de analizat	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programele de procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei.
	Bond Oracle HER2 IHC System este utilizat în afara termenului său de valabilitate	Verificați dacă Bond Oracle HER2 IHC System este utilizat în interiorul termenului de valabilitate indicat.
Colorare imunohistochimică specifică excesivă	Recuperarea necorespunzătoare a epitopului	Asigurați-vă că reactivii BOND Epitope Retrieval au fost alocați recipientelor de mare capacitate corespunzătoare și că programul BOND este setat implicit la protocolul *HIER 25 min with ER1 (97).
	Variația în modul de fixare	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programele de procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei. Dacă este posibil, retestați cazul folosind un alt bloc. Dacă acest lucru nu este posibil, evaluați zonele care prezintă profilurile de fixare cele mai bune față de secțiunea colorată cu H&E (Hematoxilină și Eozină).

Problemă	Cauză probabilă	Acțiune de remediere
Colorație de fond nespecifică	Dozarea neadecvată a reactivului stoc	Verificați dacă toți reactivii BOND au fost introduși în recipientele de mare capacitate corespunzătoare și așezați în pozițiile corecte în aparat.
	Deparafinizare necorespunzătoare a lamelor	Verificați dacă este selectat modul *Dewax în câmpul Preparation (Preparare) al casetei de dialog Add slide (Adăugare lamă).
	Reacție încrucișată imunohistochimică nespecifică în țesut	Consultați descrierea sistemului Bond Oracle HER2 IHC System referitoare la reactivitatea încrucișată în țesuturile normale (consultați Tabelul 13).
	Reacție încrucișată imunohistochimică nespecifică cu zone de necroză de țesut	Verificați dacă se utilizează un fixativ pe bază de formol și că programele de procesare sunt adecvate pentru proba supusă analizei. Dacă este posibil, retestați cazul folosind un alt bloc. Dacă acest lucru nu este posibil, evaluați zonele care prezintă profilurile de fixare cele mai bune comparativ cu secțiunea colorată cu H&E (Hematoxilină și Eozină).
	Artefacte de uscarea după finalizarea ciclului de colorare	Dacă lamele sunt așezate pentru un ciclu pe timpul nopții se recomandă utilizarea funcției BOND de pornire temporizată. Verificați dacă volumul de apă distilată sau demineralizată este suficient pentru a fi distribuit pe lame în această perioadă cu scopul de a evita uscarea lamelor.
	Secțiunile aderă la lame cu ajutorul unor aditivi pe bază de amidon	Utilizați lame fără amidon (Leica BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040).
Țesut detașat de pe lamele de pacient/control	Utilizarea unui tip necorespunzător de lame sau uscarea incorectă a secțiunii	Verificați dacă se utilizează lame corespunzătoare pentru secțiunile de pacient/control (Leica BOND Plus Slides – cod produs S21.2113 sau Apex BOND Slides cod produs 3800040). Verificați dacă lamele sunt corect uscate și că sunt incubate timp de 12–18 ore la 37 °C (peste noapte). Secțiunile care necesită o adeziune suplimentară pot fi incubate la 60 °C pentru încă o oră.

Tabelul 16. Bond Oracle HER2 IHC System Ghid de soluționare a problemelor.

Dacă vreo problemă asociată cu sistemul Bond Oracle HER2 IHC System nu intră în sfera de aplicare a acestui ghid de soluționare a problemelor (consultați Tabelul 12), vă rugăm să contactați Departamentul tehnic de service Leica Biosystems sau distribuitorul local pentru asistență.

## Bibliografie

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<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. 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 $\alpha$  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: 836-843.
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. Nadjji, 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.










### Modificări ale edițiilor anterioare

Precizia între aparate (BOND-MAX față de BOND-III).

### Data publicării

13 ianuarie 2020

### Identificare simboluri

	Cod lot		Conservare		Număr de catalog
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro		Producător		Fragil
	Consultați instrucțiunile de utilizare		Conținut suficient pentru <n> teste		A se utiliza până la data de AAAA-LL-ZZ
<b>SN</b>	Serie				

HercepTest™ este o marcă comercială a, și intră sub licența deținută de DakoCytomation, Denmark A/S Herceptin® este o marcă comercială a Genentech, Inc. și a F. Hoffmann-La Roche Ltd.