

**Estrogen Receptor Clone 6F11
Liquid Concentrate
Primary Antibody, Novocastra™
Catalog No: NCL-L-ER-6F11**



Instructions for Use

Please read before using this product.

Check the integrity of the packaging before use.

Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™

Catalog No: NCL-L-ER-6F11

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Estrogen Receptor Clone 6F11 (ER 6F11) Mouse Monoclonal antibody is intended for laboratory use to qualitatively identify estrogen receptor (ER) antigen in sections of formalin fixed, paraffin embedded breast cancer tissue by immunohistochemistry methods. Estrogen Receptor Clone 6F11 specifically binds to the ER antigen located in the nucleus of ER positive normal and neoplastic cells.

Estrogen Receptor Clone 6F11 is indicated as an aid in the management, prognosis and predication of therapy outcome of breast cancer. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ is optimized for use on the Leica Biosystems BOND-III staining platform using the Bond Polymer Refine Detection kit.

Summary and Explanation

Estrogen receptor (ER) content of breast cancer tissue is an important parameter in the prediction of prognosis and response to endocrine therapy. The introduction of monoclonal antibodies to ER has allowed the determination of receptor status of breast tumors to be carried out in routine histopathology laboratories. Estrogen Receptor Clone 6F11 is a mouse monoclonal antibody directed against the human estrogen receptor molecule. A prokaryotic recombinant protein, corresponding to the full-length alpha form of human ER molecule was used as the immunogen. Estrogen Receptor Clone 6F11 has been shown to react with a 66 kD protein from MCF-7 cell lysates via Western blot¹.

Principle of Procedure (Manual Method)

Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ is recommended for use in an immunohistochemical (IHC) procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps. Prior to staining, endogenous peroxidase activity is blocked and sections are subjected to epitope retrieval. The section is subsequently incubated with the primary antibody. A biotin-conjugated secondary antibody formulation

that recognizes mouse immunoglobulins is used to detect the primary antibody. A streptavidin-peroxidase conjugate is then applied and binds to the biotin present on the secondary antibody. Sections are further incubated with the substrate/ chromogen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), and DAB Substrate Buffer. Reaction with the peroxidase produces a visible brown precipitate at the antigen site. Sections are counterstained with hematoxylin and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope.

Principle of Procedure (Automated Method - BOND-III system)

Immunohistochemical techniques can be used to demonstrate the presence of antigens in tissue and cells (see “Using BOND Reagents” in your BOND user documentation). Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ should be diluted in Bond Antibody Diluent (AR9352) at a dilution of 1:50 for use on the automated BOND-III system in combination with Bond Polymer Refine Detection. The recommended staining protocol for Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ is IHC Protocol F. Heat induced epitope retrieval is recommended using Bond Epitope Retrieval Solution 1 for 20 minutes. Bond Polymer Refine Detection utilizes a novel controlled polymerization technology to prepare polymeric HRP-linker antibody conjugates. The detection system avoids the use of streptavidin and biotin, and therefore eliminates nonspecific staining as a result of endogenous biotin.

Bond Polymer Refine Detection works as follows:

- The specimen is incubated with hydrogen peroxide to quench endogenous peroxidase activity
- Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ is applied
- A post primary antibody solution enhances penetration of the subsequent polymer reagent
- A poly-HRP anti-mouse/rabbit IgG reagent localizes the primary antibody
- The substrate chromogen, 3,3'- diaminobenzidine (DAB), visualizes the complex via a brown precipitate
- Hematoxylin (blue) counterstaining allows the visualization of cell nuclei.

Using Bond Polymer Refine Detection in combination with the automated BOND-III system reduces the possibility of human error and inherent variability resulting from individual reagent dilution, manual pipetting and reagent application.

Reagent Provided

Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ is a liquid tissue culture supernatant containing sodium azide as a preservative.

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to the full-length alpha form of the human estrogen receptor molecule.

Specificity

Human estrogen receptor.

Clone

6F11

Ig Class

IgG1

Total Protein Concentration Total Protein

Refer to vial label for batch specific Ig and total protein concentrations.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Antibody Development

Estrogen Receptor Clone 6F11 was raised against recombinant ER protein that was expressed from cDNA derived from mRNA extracted from the cell line MCF-7. Balb/c mice were immunized with the resulting (His)6- tagged ER recombinant antigen. Screening was conducted by ELISA, with ELISA positive supernatants tested on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of breast carcinoma of known receptor status. Colonies demonstrating positive immunohistochemical staining were cloned by limiting dilution.

Recommendations on Use (Manual Method)

Suggested dilution: 1:40–1:80 for 60 minutes at 25° C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions. Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results necessitating regular performance of in-house controls (see Quality Control section).

Recommendations on Use (Automated Method - BOND-III system)

Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ should be diluted in Bond Antibody Diluent (AR9352) at a dilution of 1:50. The recommended staining protocol for Estrogen Receptor Clone 6F11 primary antibody is IHC Protocol F. Heat induced epitope retrieval is recommended using Bond Epitope Retrieval Solution 1 for 20 minutes.

Specimen Preparation

All specimens must be prepared to preserve the tissue for immunohistochemical staining.

Standard methods of tissue processing should be used for all specimens.

It is recommended that tissues are prepared in formalin-based fixatives and are routinely processed and paraffin-embedded. For example, resection specimens should be blocked into a thickness of 3–4 mm and fixed for 18–24 hours in 10% neutral-buffered formalin. The tissues should then be dehydrated in a series of alcohols and cleared through xylene, followed by impregnation with molten paraffin wax, held at no more than 60 °C. Tissue specimens should be sectioned between 3–5 µm.

To preserve antigenicity, tissue sections mounted on slides should be stained within 4–6 weeks of sectioning when held at room temperature (20–25 °C). Following sectioning, it is recommended that slides are incubated at 60 °C for one hour to assist with adherence.

In the USA, the Clinical Laboratory Improvement Act of 1988 requires in 42 CFR 493.1259(b) that “The laboratory must retain stained slides for at least ten years from the date of examination and retain specimen blocks at least two years from the date of examination”.

Warnings and Precautions

- This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.
- This reagent contains sodium azide. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com
- Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.
- Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions².
- Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens.

- If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.
- Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.
- Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens formalin-fixed, processed and paraffin-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation³. The recommended positive control tissue for use with Estrogen Receptor Clone 6F11 is a weakly positive breast carcinoma.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. The recommended negative control tissue for use with Estrogen Receptor Clone 6F11 is tonsil (endothelium).

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically⁴. False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may

be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively.

If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site. Normal mouse sera diluted to the same concentration as the primary antibody may be used as a negative control reagent.

Assay Verification

Prior to initial use of an antibody or staining system in a diagnostic procedure, the user should verify the antibody's specificity by testing it on a series of in-house tissues with known immunohistochemical performance characteristics representing known positive and negative tissues. Refer to the quality control procedures previously outlined in this section of the product insert and to the quality control recommendations of the CAP Certification Program for Immunohistochemistry and/or the NCCLS IHC guideline. These quality control procedures should be repeated for each new antibody lot, or whenever there is a change in assay parameters. Tissues listed in the Performance Characteristics Section are suitable for assay verification.

Staining Procedure (Automated Method - BOND-III system)

Verification and validation of the recommended staining procedure for each detection kit is demonstrated through design control testing and results of clinical studies.

Any modification to the recommended staining procedure nullifies the Performance Characteristics provided in this package insert. The user must validate any modification to the recommended staining procedure.

Follow the procedure below to perform staining.

1. On the BOND-III System, ensure the bulk and hazardous waste containers have enough capacity to perform the required staining runs.
2. Ensure there is adequate alcohol, distilled or de-ionized water, Bond Dewax Solution (supplied as ready-to-use), Bond Epitope Retrieval Solution 1 (supplied as ready-to-use) and Bond Wash Solution (supplied as 10X concentrate) in the bulk reagent containers to perform the required staining runs.
3. Ensure that a clean BOND-III Mixing Station is installed.

4. Turn on the BOND-III fully automated, advanced staining system.
5. Turn on the PC attached to the BOND-III fully automated, advanced staining system.
6. Open the BOND software.
7. For a new DS9800 Bond Refine Kit, scan the reagent barcode with the handheld scanner to enter the system into the BOND reagent inventory. For a new BOND Open Container, scan the barcode with the hand held scanner and select NCL-L-ER-6F11 from the drop down list. Enter reagent lot number and expiry date.
8. Go to the Slide setup screen and click Add case.
9. Enter details for the first case. Ensure the dispense volume is set to 150 μ L and the preparation protocol is *Dewax. Click OK.
10. With the case highlighted in the Slide setup screen click Add slide.
11. First, add patient test slides. Ensure tissue type is set to Test tissue.
12. Confirm the dispense volume is 150 μ L and the preparation protocol is *Dewax.
13. Select staining mode values Single.
14. Select process IHC.
15. Select NCL-L-ER-6F11 from the marker list. The Protocols tab defaults to the correct staining protocol (*IHC Protocol F) and HIER protocol (*HIER 20 min with ER1).
16. Click Add slide. The test slide is created.
17. Repeat steps 9 to 17 until all cases and test slides have been created.
18. Print slide labels and label slides appropriately.
19. Open the lids of all BOND containers and load the reagent tray onto the BOND-III System.
20. Place slides onto the slide tray. Apply BOND Covertile for each test slide.
21. Load the slide tray onto the BOND-III and press the Load/Unload button.
22. Confirm that the slides have been scanned and click the Run (Play) button on the System status screen.
23. Ensure that the tray indicator field displays Proc (OK) and batch number and finish time are displayed.
24. When the run is completed press the Load/Unload button and remove the slide trays from the BOND-III.
25. Remove Covertiles and rinse the slides in de-ionized water.
26. Dehydrate, clear and mount sections.

Interpretation of Staining

Positive Tissue Control

The positive tissue control stained with Estrogen Receptor Clone 6F11 should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

The negative tissue control should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody cross reactivity to cells/cellular components. If specific staining (false positive staining) occurs in the negative external tissue control, results with the patient specimen should be considered invalid.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results.

Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with Estrogen Receptor Clone 6F11 last. The staining pattern of Estrogen Receptor Clone 6F11 is nuclear. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Cautionary Note: Staining may also be present in stromal cells, endothelial cells, lymphocytes and other tissue elements. Interpretation should be assessed in the context of the sample being assessed.

Assay Interpretation

For the determination of estrogen receptor expression, only a nuclear staining pattern should be evaluated. A pathologist using a bright-field microscope should perform slide evaluation. For evaluation of the immunohistochemical staining and scoring, an objective of 10x magnification is appropriate. The use of 20-40x objective magnification should be used in the conformation of the score. Cytoplasmic staining should be considered as non-specific staining and is not to be included in the assessment.

The American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Arch Pathol Lab Med. 2010; 134: e48–e72), should be used for assay interpretation.

Specifically, evaluation is defined as:

- Positive for ER if finding of $\geq 1\%$ of tumor cell nuclei are immunoreactive.
- Negative for ER if finding of $< 1\%$ of tumor cell nuclei are immunoreactive in the presence of evidence that the sample can express ER (positive intrinsic controls are seen).
- Uninterpretable for ER if finding that no tumor nuclei are immunoreactive and that internal epithelial elements present in the sample or separately submitted from the same sample lack any nuclear staining.

Troubleshooting

Contact Leica Biosystems Technical Service (800) 248-0123 Tech Support USA to report unusual staining results.

General Limitations:

- Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.
- Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue⁵.
- Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
- The clinical interpretation of any positive or negative staining should be evaluated within the context of clinical presentation, morphology and other histopathological criteria. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be complemented by morphological studies using proper positive and negative internal and external controls as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist who is familiar with the proper use of IHC antibodies, reagents and methods to interpret all of the steps used to prepare and interpret the final IHC preparation.
- The manufacturer provides these antibodies/reagents for use at optimal dilution following the provided instructions for IHC on prepared tissue sections. Any deviation from recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results.
- This product is not intended for use in flow cytometry. Performance characteristics have not been determined for flow cytometry.

- Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit non-specific staining with horseradish peroxidase.
- Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated due to biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues.
- Normal/non-immune sera from the same animal source as secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to auto-antibodies or natural antibodies.
- False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (e.g. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used.

Product Specific Limitations

Estrogen Receptor Clone 6F11 has been optimized at Leica Biosystems. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of patient results under these circumstances. The protocol times may vary, due to variation in tissue fixation and the effectiveness of antigen enhancement, and must be determined empirically. Negative reagent controls should be used when optimizing retrieval conditions and protocol times.

Performance Characteristics

Immunoreactivity

Normal Tissues

Estrogen Receptor Clone 6F11 detects the estrogen receptor alpha (ER) antigen in the nuclei of cells that express high levels of ER, a proportion of endometrial, ovarian and myometrial cells, and normal breast ductal cells. Staining may also be present in stromal cells, endothelial cells, lymphocytes and other tissue elements. Table 1 contains a summary of ER immunoreactivity with the recommended panel of normal tissues.

Table 1: Reactivity of Estrogen Receptor Clone 6F11 on Normal Tissues

Tissue	Number of cases	Description of Staining	Staining Intensity (0-3+)
Adrenal	3	No staining of tissue elements	0
Brain, Cerebellum	3	No staining of tissue elements	0
Brain, Cerebrum	3	No staining of tissue elements	0
Breast	5	Duct nuclei in 4/5 tissues	1+
Cervix	3	Squamous epithelium and muscle	2+
Colon	3	No staining of tissue elements	0
Esophagus	3	No staining of tissue elements	0
Heart	3	No staining of tissue elements	0
Kidney	3	No staining of tissue elements	0
Liver	3	No staining of tissue elements	0
Lung	3	No staining of tissue elements	0
Mesothelial cells	1	No staining of tissue elements	0
Ovary	3	No staining of tissue elements	0
Pancreas	3	No staining of tissue elements	0
Peripheral nerve	2	No staining of tissue elements	0
Pituitary	3	No staining of tissue elements	0
Prostate	3	No staining of tissue elements	0
Salivary/ Submandibular gland	3	No staining of tissue elements	0
Skeletal muscle	4	No staining of tissue elements	0
Skin	3	No staining of tissue elements	0
Small intestine	3	No staining of tissue elements	0
Spleen	3	No staining of tissue elements	0
Stomach	3	No staining of tissue elements	0
Testis	3	No staining of tissue elements	0
Thymus	3	No staining of tissue elements	0
Thyroid	3	No staining of tissue elements	0
Tonsil	4	No staining of tissue elements	0
Uterus	7	Endometrial glands and stromal cells in 6/7 tissues	2+
Bone marrow	3	No staining of tissue elements	0

Key to Staining Intensity; 0 – Negative 1+ – Weak 2+ – Moderate 3+ – Strong

Clinical Outcome Study

The Estrogen Receptor Clone 6F11 was tested in an independent clinical outcome study. In summary, the study used a retrospective Calgary-based patient cohort (n=532) composed of breast cancer patients diagnosed between 1985 and 2000, who were treated with primary adjuvant tamoxifen regardless of their ER and PR status. This cohort possesses several unique characteristics that lend to this study, including: it has greater than 5 years of follow-up; it was enriched for events to increase its statistical power; it contains ER negative patients so as to remove treatment selection bias.

To assess differences between methods in the study, the following statistical methods were evaluated and the outcomes described:

1. The Cohen's Kappa statistic to quantify the ease of reproducibility of Allred scoring method (Inter- and Intra-Observer).

Results indicated that Inter-observer kappa for the Leica Biosystems platform showed almost perfect agreement for ER, with $\kappa=0.67$ between Observers 1 and 2, $\kappa=0.75$ between Observers 1 and 3, and a $\kappa=0.83$ between Observers 2 and 3. Slides were also rescored by Observer 1 three months after the original scoring and intra-observer kappa was calculated with almost perfect agreement of $\kappa=0.91$.

2. Univariate Kaplan-Meier and Multivariate Cox survival analysis using the Allred cutpoint for hormone receptor positivity to dichotomize patients into survival groups.

The univariate outcome is shown in figure 1.

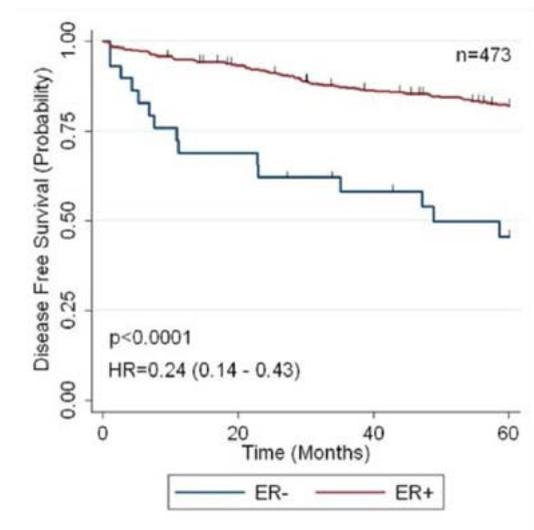


Figure 1: Univariate Analysis for the Leica test Device

Multivariate Cox models were analyzed along with lymph node status, tumor grade, tumor size and HER2 status. The model is shown in figure 2.

	Leica Device (n=363)		
	HR	95% CI	p-value
ER Status	0.39	(0.19 – 0.78)	0.008
Lymph Node Status	3.18	(1.88 – 5.37)	<0.001
Tumor Grade	3.15	(1.84 – 5.38)	<0.001
Tumor Size	1.67	(0.94 – 2.98)	0.083
HER2 Status	1.13	(0.38 – 3.33)	0.823

Figure 2: Multivariate model for the Leica test Device

3. Measures of test performance; sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), were calculated. For these calculations, the ligand-binding assay (LBA) was used as the gold standard (figure 3). Also, the Leica assay and the LBA using progression on tamoxifen as the gold standard (figure 4) were calculated.

In this study, each measured test performance can be defined as:

Sensitivity is defined as the proportion of positive subjects correctly identified by the test.

Specificity is defined as the proportion of negative subjects correctly identified by the test.

PPV is defined as the proportion of subjects with a positive test result who were correctly diagnosed.

NPV is defined as the proportion of subjects with a negative test result who were correctly diagnosed.

Figures 3 and 4 show the results obtained.

	Leica Device
Sensitivity	0.97
Specificity	0.44
PPV	0.96
NPV	0.70

Figure 3: Measure of test performance (LBA = Gold Standard)

	Leica Device	LBA
Sensitivity	0.96	0.96
Specificity	0.16	0.16
PPV	0.82	0.84
NPV	0.52	0.44

Figure 4: Measure of test performance (Progression = Gold Standard)

Results from this study show that the test device, the Estrogen Receptor Clone 6F11 has excellent correlation in identification of the optimal clinical assay for the determination of endocrine treatment response in breast cancer.

Reproducibility Study

Reproducibility was performed on the BOND-III system using formalin fixed paraffin embedded tissue micro array sections and whole tissue sections of invasive breast tumor.

BOND-III Precision Results

Within Run Precision Study (intra assay – single instrument)

Testing was conducted on one SSA using 104 test data points with the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™, three times, over three different days.

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	79	0
	Negative	0	25
Overall Percent Agreement (95% CI)		100 (97.16-100.00)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		100 (96.28-100)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100 (88.71-100)	

Within Instrument Precision Study (inter assay - single Instrument)

Testing was conducted on three SSA's using 313 test data points with the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™, three times, over three different days.

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	236	1
	Negative	0	76
Overall Percent Agreement (95% CI)		99.68 (98.23-99.99)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		100 (98.74-100)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		98.70 (92.96-99.97)	

Between Run Precision Study (inter assay - day-to-day - single instrument)

Testing was conducted on one SSA using 175 test data points with the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™, five times, over five different days, performed over a twenty (20) day period.

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	132	0
	Negative	0	43
Overall Percent Agreement (95% CI)		100 (98.30-100.00)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		100 (97.76-100)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100 (93.27-100)	

Between Laboratory Precision Study (site-to-site - inter assay - multiple instruments)

Testing was conducted on one SSA using 104 test data points with the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™, at 3 investigational sites (Sites A, B and C).

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	78	0
	Negative	0	26
Overall Percent Agreement (95% CI)		100 (97.16-100.00)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		100 (96.23-100)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100 (89.12-100)	

Lot to Lot Precision Study

Testing was conducted on one SSA using 107 test data points with the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™, using three (3) independently manufactured reagent lots of the test device.

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	80	0
	Negative	0	27
Overall Percent Agreement (95% CI)		100 (97.24-100.00)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		100 (96.32-100)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100 (89.50-100)	

Between Observer Precision Study

Between observer precision testing was evaluated between 3 observers at 1 investigational site (Site A). Twenty (20) whole section breast cancer cases consisting of 5x Positive (Strong Intensity Expression) Profile Breast Carcinoma cases, 5x Positive (Medium Intensity Expression) Profile Breast Carcinoma cases, 5x Positive (Weak Intensity Expression) Profile Breast Carcinoma cases and 5x Negative Profile Breast Carcinoma were used.

Between observer agreement between Observer 1 and Observer 2 was 89.47% (17/19). One case was omitted as it was reported by observer 1 as invasive tumor, while Observer 2 reported this as ductal carcinoma in-situ (DCIS) only, indicating a difference in the primary diagnosis of breast cancer.

Between observer agreement between Observer 1 and Observer 3 was 94.74% (18/19). One case was omitted as it was reported by observer 1 as invasive tumor, while Observer 2 reported this as ductal carcinoma in-situ (DCIS) only, indicating a difference in the primary diagnosis of breast cancer.

Between observer agreement between Observer 2 and Observer 3 was 94.74% (18/19). One case was omitted as both observers reported a single case as ductal carcinoma in-situ (DCIS) only.

Between observer agreement between Observer 1, Observer 2 and Observer 3 was 96.49% (55/57). One case was omitted as it was reported by observer 1 as invasive tumor, while Observers 2 and 3 reported this as ductal carcinoma in-situ (DCIS) only, indicating a difference in the primary diagnosis of breast cancer.

Inter-Site Reproducibility

Inter-site reproducibility testing of the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III was evaluated at 3 investigational sites on whole tissue sections. The test cohort consisted of 18 cases. Testing was performed over a span of 5 non-consecutive days, with each site staining a full set of cases on each day. This provided 9 replicates of 18 cases.

Results for Inter-Site reproducibility are presented as overall (3 sites combined), site to site (2 sites) and by single site alone (within-site).

Overall (3 sites combined)

Inter-Site agreement between Site A, Site B and Site C was 96.30 % (95% confidence interval of 92.11% to 96.63%) as shown in the table below.

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	111	0
	Negative	6	45
Overall Percent Agreement (95% CI)		96.30% (92.11-98.63)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		94.87% (89.17-98.10)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100% (93.56-100)	

Inter-site agreement between Site A and Site B was 94.44% (51/54).

Inter-site agreement between Site A and Site C was 94.44% (51/54).

Inter-site agreement between Site B and Site C was 92.59% (50/54).

Within-site agreement for Site A alone was 100% (54/54).

Within-site agreement for Site B alone was 96.30% (52/54).

Within-site agreement for Site C alone was 96.30% (52/54).

Lot to Lot Precision Study

Lot to lot reproducibility testing of the Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ was evaluated at a single investigational site on whole tissue sections. The test cohort consisted of 18 cases. Testing was conducted using three (3) independently manufactured reagent lots. This format provided 3 replicates of each slide (one for each reagent lot).

		Positive	Negative
Estrogen Receptor Clone 6F11 Liquid Concentrate Primary Antibody, Novocastra™ on the BOND-III	Positive	32	0
	Negative	1	21
Overall Percent Agreement (95% CI)		98.15% (90.11-99.95)	
Positive Percent Agreement (95% CI)		96.97% (84.24-99.92)	
Negative Percent Agreement (95% CI)		100% (86.71-100)	

Published Immunoreactivity

Characterization of Estrogen Receptor Clone 6F11 during antibody development included a comparative evaluation of a series of 55 sequential breast carcinomas. The tissues evaluated were routinely processed formalin-fixed, paraffin-

embedded specimens stained using both Estrogen Receptor Clone 6F11 and ER 1D5. There was an observed concordance of staining between Estrogen Receptor Clone 6F11 and ER 1D5 for 50/55 cases¹.

Estrogen receptor status was evaluated in 592 cases using routinely prepared paraffin-embedded tissue samples from primary breast carcinomas with Estrogen Receptor Clone 6F11 and ER 1D5. Overall, 1D5 and Estrogen Receptor Clone 6F11 showed a 97.5% concordance rate⁶.

Bibliography

1. Bevitt DJ, Milton ID, Piggot N et al. New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry. *Journal of Pathology* 1997; 183(2), 228–232.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Omata M, Liew CT, 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.
6. Kaplan, P.A. et. al. 1D5 and 6F11 an immunohistochemical comparison of two monoclonal antibodies for the evaluation of estrogen receptor status in primary breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2005: 276–280.
7. Diaz L, Sahin A and Sneige N. Immunohistochemical detection of estrogen receptor in breast cancer: a laboratory quality improvement study. *United States and Canadian Academy of Pathology (Annual Meeting Abstracts March 22–28), 2003; 27A.*
8. Dabbs DJ, Landrenau RJ, Liu Y et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(2), 403–405.
9. Khan SA, Yee KA, Kaplan C et al. Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time. *International Journal of Cancer* 2002; 102(4), 334–337.
10. Radzikowska E, Langfort R and Giedronowicz D. Estrogen and progesterone receptors in non small cell lung cancer patients. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 8(2), 69–73.
11. Leav I, Lau KM, Adams JY, et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *American Journal of Pathology* 2001; 159(1), 79–92.

12. Braidman IP, Baris C, Selby PL et al. Preliminary report of impaired oestrogen receptor- α expression in bone, but no involvement of androgen receptor, in male idiopathic osteoporosis. *Journal of Pathology* 2000; 192, 90–96.
13. de las Mulas JM, van Niel M, Millan Y et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domest Anim Endocrinol* 2000; 18(1), 111–125.
14. Khan SA, Rogers MA, Khuruna KK et al. Oestrogen receptor expression in normal breast epithelium. *European Journal of Cancer* 2000; 36(Suppl 4), S27–S28.
15. Leake R, Barnes D, Pinder S et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *Journal of Clinical Pathology* 2000; 53(8), 634–635.
16. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E et al. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 2000; 37(6), 536–545.
17. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17(5), 1474–1481.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Explanation of Symbols

	Manufacturer		Temperature limitations		Total Protein Concentration
	In vitro diagnostic device		Batch number		
	Consult instructions for use		Use by		

Date of Issue

17 June 2016

Estrogen Receptor Clone 6F11

Anticorps primaire sous forme de concentré liquide, Novocastra™

Numéro de référence : NCL-L-ER-6F11

Utilisation prévue

Réservé à un usage de diagnostic in vitro.

L'anticorps monoclonal de souris Estrogen Receptor Clone 6F11 (ER 6F11) est destiné à être utilisé en laboratoire pour l'identification qualitative de l'antigène récepteur d'œstrogènes (ER) dans des coupes de tissus du cancer du sein fixés au formol et enrobés de paraffine en utilisant des méthodes immunohistochimiques. L'Estrogen Receptor Clone 6F11 se lie spécifiquement à l'antigène ER situé dans le noyau des cellules néoplasiques et normales ER positives.

Estrogen Receptor Clone 6F11 est indiqué comme une aide dans la prise en charge, le pronostic et la prédiction du résultat thérapeutique du cancer du sein. L'interprétation clinique de toute coloration ou de son absence doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée dans le contexte des antécédents cliniques du patient et des autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, est optimisé pour une utilisation sur la plate-forme de coloration Leica Biosystems BOND-III à l'aide du kit Bond Polymer Refine Detection.

Résumé et explication

La teneur en récepteurs d'œstrogènes (ER) du tissu du cancer du sein est un paramètre important dans la prédiction du pronostic et la réponse au traitement endocrinien. L'introduction d'anticorps monoclonaux anti-ER a permis de déterminer le statut des récepteurs des tumeurs du sein dans les laboratoires d'histopathologie de routine. L'Estrogen Receptor Clone 6F11 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la molécule du récepteur d'œstrogènes humain. Une protéine recombinante procaryotique, correspondant à la forme alpha pleine longueur de la molécule ER humaine, a été utilisée en tant qu'immunogène. Il a été démontré par le biais du Western blot que l'Estrogen Receptor Clone 6F11 réagit avec une protéine de 66 kD provenant des lysats de cellules MCF-7¹.

Principe de la procédure (méthode manuelle)

L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ est recommandé pour une utilisation dans une procédure

immunohistochimique (IHC) qui permet l'identification qualitative par microscopie optique d'antigènes dans des coupes de tissus fixés au formol et enrobés de paraffine, par le biais d'étapes séquentielles avec des étapes de lavage interposées. Avant la coloration, l'activité de la peroxydase endogène est bloquée et les coupes sont soumises à la récupération des épitopes. La coupe est incubée par la suite avec l'anticorps primaire. Une formulation d'anticorps secondaire conjugué à la biotine qui reconnaît les immunoglobulines de souris est utilisée pour détecter l'anticorps primaire. Un conjugué de streptavidine-peroxydase est appliqué ensuite et se lie à la biotine présente sur l'anticorps secondaire. Des coupes sont incubées davantage avec le substrat/chromogène, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), et le tampon de substrat DAB. La réaction avec la peroxydase produit un précipité marron visible au niveau du site de l'antigène. Les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline et couvertes d'une lamelle couvre-objet. Les résultats sont interprétés avec un microscope optique.

Principe de la procédure (méthode automatisée - système BOND-III)

Des techniques immunohistochimiques peuvent être utilisées pour démontrer la présence d'antigènes dans le tissu et les cellules (consultez « Utilisation de réactifs BOND » dans votre documentation utilisateur BOND). L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ doit être dilué dans du Bond Antibody Diluent (AR9352) à une dilution de 1:50 pour une utilisation sur le système BOND-III automatisé en combinaison avec le système Bond Polymer Refine Detection. Le protocole de marquage recommandé pour l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ est l'IHC Protocol F. La récupération des épitopes induite par la chaleur est recommandée avec l'utilisation de la Bond Epitope Retrieval Solution 1 pendant 20 minutes. Le système Bond Polymer Refine Detection utilise une nouvelle technologie de polymérisation contrôlée pour préparer des conjugués de HRP polymérique-anticorps lieu. Le système de détection évite l'utilisation de la streptavidine et de la biotine, et élimine par conséquent une coloration non spécifique produite par la biotine endogène.

Le système Bond Polymer Refine Detection fonctionne de la manière suivante :

- L'échantillon est incubé avec du peroxyde d'hydrogène pour annuler l'activité de la peroxydase endogène
- L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ est appliqué
- Une solution post anticorps primaire améliore la pénétration du réactif polymère ultérieur
- Un réactif anti-IgG de souris/lapin couplé à un polymère HRP localise l'anticorps primaire
- Le substrat chromogène, 3,3'- diaminobenzidine (DAB), visualise le complexe par le biais d'un précipité marron
- Une contre-coloration (bleue) à l'hématoxyline permet la visualisation des noyaux des cellules.

L'utilisation du système Bond Polymer Refine Detection en combinaison avec le système BOND-III automatisé réduit la possibilité d'erreur humaine et la variabilité inhérente qui résulte de la dilution de réactifs individuels, du pipetage manuel et de l'application des réactifs.

Réactif fourni

L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ est un supernageant de culture tissulaire liquide contenant un conservateur constitué d'azoture de sodium.

Immunogène

Une protéine recombinante procaryotique, correspondant à la forme alpha pleine longueur de la molécule réceptrice d'œstrogènes humaine.

Spécificité

Récepteur d'œstrogènes humain.

Clone

6F11

Classe Ig

IgG1

Concentration totale en protéines

Total Protein

Consultez l'étiquette du flacon pour connaître les concentrations en Ig et en protéines totales spécifiques au lot.

Conservation et stabilité

Conservez entre 2 °C et 8 °C. Ne pas congeler. Remettez la solution entre 2 °C et 8 °C immédiatement après utilisation. N'utilisez pas au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon. L'utilisateur doit vérifier les conditions de conservation différentes de celles précisées ci-dessus.

Développement d'anticorps

L'Estrogen Receptor Clone 6F11 a été élevé contre une protéine ER recombinante exprimée à partir de l'ADNc dérivé de l'ARNm extrait de la lignée de cellules MCF-7. Les souris Balb/c ont été immunisées avec l'antigène recombinant ER marqué (His)₆ résultant. Le dépistage a été réalisé par la méthode ELISA ; les supernageants qui se sont avérés positifs avec ELISA ont été testés sur des coupes de carcinome mammaire ayant un statut de récepteur connu, fixées au formol et enrobées de paraffine. Les colonies présentant un marquage immunohistochimique positif ont été clonées en limitant la dilution.

Recommandations d'utilisation (méthode manuelle)

Dilution suggérée: 1:40–1:80 pendant 60 minutes à 25 °C. La récupération des antigènes à température élevée en utilisant une solution de récupération à base de citrate 0,01 M (pH 6,0) est recommandée. Ces informations sont fournies à titre d'indication et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales. Les différences dans le traitement des tissus et les procédures techniques mises en œuvre dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner une variabilité importante des résultats, nécessitant des contrôles internes réguliers des performances (consultez la section Contrôle qualité).

Recommandations d'utilisation (méthode automatisée - système BOND-III)

L'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ doit être dilué dans du Bond Antibody Diluent (AR9352) à une dilution de 1:50. Le protocole de marquage recommandé pour l'anticorps primaire Estrogen Receptor Clone 6F11 est l'IHC Protocol F. La récupération des épitopes induite par la chaleur est recommandée avec l'utilisation de la Bond Epitope Retrieval Solution 1 pendant 20 minutes.

Préparation des échantillons

Tous les échantillons doivent être préparés de manière à conserver le tissu pour le marquage immunohistochimique.

Des méthodes standard de traitement des tissus doivent être utilisés pour tous les échantillons.

Il est recommandé que les tissus soient préparés dans des fixatifs à base de formol et qu'ils soient traités et enrobés de paraffine systématiquement. Par exemple, les échantillons de résection doivent être mis en blocs d'une épaisseur de 3 à 4 mm et fixés pendant 18 à 24 heures dans du formol tampon neutre à 10 %. Les tissus doivent ensuite être déshydratés dans une série d'alcools et éclaircis dans du xylène; par la suite, ils sont imprégnés avec de la paraffine fondue, maintenue à une température de 60 °C maximum. Les échantillons de tissu doivent être en coupes de 3 à 5 µm.

Afin de conserver l'antigénicité, les coupes de tissu montées sur lames doivent être marquées dans les 4 à 6 semaines suivant la coupe lorsqu'elles sont maintenues à température ambiante (20 à 25 °C). Après la coupe, il est recommandé d'incuber les lames à 60 °C pendant une heure pour faciliter l'adhérence.

Le règlement CLIA américain (Clinical Laboratory Improvement Act) de 1988 spécifie dans la recommandation 42 CFR 493.1259(b) que « le laboratoire doit conserver les lames marquées au moins dix ans à compter de la date de l'examen et conserver les blocs d'échantillons au moins deux ans à compter de la date de l'examen ».

Avertissements et précautions

- Ce réactif a été préparé à partir du surnageant de culture cellulaire. Comme il s'agit d'un produit biologique, il convient de prendre des précautions raisonnables lors de sa manipulation.
- Ce réactif contient de l'azote de sodium. Une fiche de données de sécurité est disponible à la demande ou sur le site www.LeicaBiosystems.com
- Consultez les réglementations nationales, régionales ou locales relatives à l'élimination des composants potentiellement toxiques.
- Les échantillons, avant et après fixation, et tous les matériels exposés aux échantillons, doivent être manipulés comme s'ils pouvaient transmettre une infection et doivent être éliminés en utilisant les précautions appropriées².
- Ne pipetez jamais les réactifs à la bouche et évitez le contact de la peau et des membranes muqueuses avec les réactifs et les échantillons.
- Si des réactifs ou des échantillons viennent en contact avec des zones sensibles, lavez abondamment à l'eau. Consultez un médecin.
- Minimisez la contamination microbienne des réactifs ; sinon une augmentation de la coloration non spécifique peut survenir.
- Les durées ou températures d'incubation, autres que celles précisées, peuvent donner des résultats erronés. Tout changement de ce type doit être validé par l'utilisateur.

Contrôle qualité

Des différences dans le traitement du tissu et les procédures techniques employées par le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner une variabilité importante des résultats, nécessitant d'effectuer régulièrement des contrôles internes, en plus des procédures qui suivent.

Les contrôles doivent être des échantillons frais obtenus par autopsie, biopsie ou chirurgie, fixés au formol, traités et enrobés de paraffine dès que possible, en procédant de la même manière que pour les échantillons du patient.

Tissu de contrôle positif

Utilisé pour indiquer que les tissus sont correctement préparés et les techniques de coloration sont appropriées. Incluez un tissu de contrôle positif pour chaque ensemble de conditions d'essai dans chaque série de coloration. Les tissus à faible coloration positive sont plus adaptés que ceux à forte coloration positive pour un contrôle qualité optimal et permettent de détecter des niveaux mineurs de dégradation des réactifs³. Un carcinome mammaire faiblement positif constitue le tissu de contrôle positif recommandé pour une utilisation avec l'Estrogen Receptor Clone 6F11.

Si le tissu de contrôle positif ne donne pas de coloration positive, les résultats des échantillons de l'essai doivent être considérés comme non valides.

Tissu de contrôle négatif

Examinez le tissu de contrôle négatif après le tissu de contrôle positif pour vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'amygdale (endothélium) constitue le tissu de contrôle négatif recommandé pour une utilisation avec l'Estrogen Receptor Clone 6F11.

Sinon, la variété des types de cellules différents présents dans la plupart des coupes de tissus conduit souvent à des sites de contrôle négatif, mais l'utilisateur doit les vérifier.

Une coloration non spécifique, le cas échéant, présente habituellement une apparence diffuse. Une coloration sporadique de tissu conjonctif peut également être observée dans des coupes de tissus fixés trop fortement au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de la coloration.

Les cellules nécrotiques ou dégénérées présentent souvent des colorations non spécifiques⁴. Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique de protéines ou de produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être dus à des enzymes endogènes comme la pseudo-péroxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C) ou la biotine endogène (p. ex., foie, seins, cerveau, reins) suivant le type d'immunomarquage utilisé. Pour différencier l'activité enzymatique endogène ou la liaison non spécifique d'enzymes par rapport à l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec un substrat chromogène ou des complexes d'enzymes (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et un substrat-chromogène, respectivement.

Si une coloration spécifique apparaît dans le tissu de contrôle négatif, les résultats sur les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Réactif de contrôle négatif

Utilisez un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque échantillon du patient pour évaluer la coloration non spécifique et permettre une meilleure interprétation de la coloration spécifique au niveau de site de l'antigène. Des sérums de souris normaux dilués à la même concentration que l'anticorps primaire peuvent être utilisés en tant que réactif de contrôle négatif.

Vérification d'analyse

Avant d'utiliser pour la première fois un anticorps ou un système de coloration dans une procédure diagnostique, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant en interne sur une série de tissus ayant des caractéristiques de performances immunohistochimiques connues et qui

représentent des tissus positifs et négatifs connus. Consultez les procédures de contrôle qualité décrites précédemment dans cette section de la notice et les recommandations de contrôle qualité du programme de certification pour l'immunohistochimie (CAP, Certification Program for Immunohistochemistry) et/ou les lignes directrices proposées par le NCCLS pour l'immunohistochimie (IHC). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou chaque fois qu'une modification est apportée aux paramètres d'analyse. Les tissus indiqués dans la section Caractéristiques de performances sont adaptés à la vérification d'analyse.

Procédure de coloration (méthode automatisée - système BOND-III)

La vérification et la validation de la procédure de coloration recommandée pour chaque kit de détection est démontrée par le biais de tests de contrôle de la conception et des résultats d'études cliniques.

Toute modification apportée à la procédure de coloration recommandée annule les caractéristiques de performances fournies dans cette notice. L'utilisateur doit valider toute modification apportée à la procédure de coloration recommandée.

Suivez la procédure ci-dessous pour réaliser la coloration.

1. Sur le système BOND-III, vérifiez que les récipients en vrac et de déchets dangereux ont assez de place pour réaliser les séries de coloration requises.
2. Veillez à ce qu'il y ait assez d'alcool, d'eau distillée ou désionisée, de Bond Dewax Solution (fournie prête à l'emploi), de Bond Epitope Retrieval Solution 1 (fournie prête à l'emploi) et de Bond Wash Solution (fournie sous forme de concentré 10X) dans les récipients de réactifs en vrac pour réaliser les séries de coloration requises.
3. Veillez à ce qu'un poste de mélange BOND-III propre soit installé.
4. Allumez le système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND-III.
5. Allumez le PC connecté au système de coloration avancé, entièrement automatisé BOND-III.
6. Ouvrez le logiciel BOND.
7. Pour un nouveau kit DS9800 Bond Polymer Refine Detection, lisez le code-barres de réactif à l'aide du lecteur portable pour entrer le système dans les stocks de réactifs BOND. Pour un nouveau Bond Open Container, lisez le code-barres à l'aide du lecteur portable et sélectionnez NCL-L-ER-6F11 dans la liste déroulante. Entrez le numéro de lot et la date de péremption.
8. Allez à l'écran Paramétrage des lames et cliquez sur Ajouter un cas.
9. Entrez les détails pour le premier cas. Veillez à ce que le volume de distribution soit réglé sur 150 µl et à ce que le protocole de préparation soit *Dewax. Cliquez sur OK.

10. Avec le cas mis en évidence à l'écran Paramétrage des lames, cliquez sur Ajouter une lame.
11. Premièrement, ajoutez les lames de test du patient. Vérifiez que le type de tissu est réglé sur Tissu de test.
12. Confirmez que le volume de distribution est de 150 µl et que le protocole de préparation est *Dewax.
13. Pour les valeurs en mode de coloration, sélectionnez Simple.
14. Pour le traitement, sélectionnez IHC.
15. Sélectionnez NCL-L-ER-6F11 dans la liste Marqueur. L'onglet Protocoles passe par défaut au protocole de marquage correct (*IHC Protocol F) et au protocole HIER (*HIER 20 min with ER1).
16. Cliquez sur Ajouter une lame. La lame de test est créée.
17. Répétez les étapes 9 à 17 jusqu'à ce que tous les cas et lames de test aient été créés.
18. Imprimez les étiquettes de lame et appliquez les étiquettes sur les lames de manière appropriée.
19. Ouvrez les couvercles de tous les récipients Bond et chargez le plateau à réactifs dans le système BOND-III.
20. Placez les lames sur le plateau de lames. Appliquez un Bond Covertile sur chaque lame de test.
21. Chargez le plateau de lames dans le système BOND-III et appuyez sur le bouton Chargement/déchargement.
22. Confirmez que les lames ont été lues et cliquez sur le bouton Série (Lecture) sur l'écran État système.
23. Vérifiez que le champ Indicateur des plateaux affiche Trait. (OK) et que le numéro de lot et l'heure de fin sont affichés.
24. Une fois la série terminée, appuyez sur le bouton Chargement/déchargement et enlevez les plateaux de lames du système BOND-III.
25. Retirez les Covertiles et rincez les lames dans de l'eau désionisée.
26. Déshydratez, éclaircissez et montez les coupes.

Interprétation de la coloration

Tissu de contrôle positif

Examinez d'abord le tissu de contrôle positif marqué avec l'Estrogen Receptor Clone 6F11 pour vous assurer que tous les réactifs fonctionnent correctement. Si le tissu de contrôle positif ne donne pas de coloration positive, les résultats des échantillons de l'essai doivent être considérés comme non valides.

Tissu de contrôle négatif

Examinez le tissu de contrôle négatif après le tissu de contrôle positif pour vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif confirme le manque de réactivité croisée de l'anticorps sur les cellules/éléments cellulaires. Si une coloration spécifique (coloration faussement positive) apparaît dans le tissu de contrôle négatif externe, les résultats sur les échantillons du patient doivent être considérés comme non valides.

Une coloration non spécifique, le cas échéant, présente habituellement une apparence diffuse. Une coloration sporadique de tissu conjonctif peut également être observée dans des coupes de tissus fixés trop fortement au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de la coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées présentent souvent des colorations non spécifiques.

Tissu du patient

Examinez les échantillons de patient marqués avec l'Estrogen Receptor Clone 6F11 en dernier. L'Estrogen Receptor Clone 6F11 produit un schéma de marquage nucléaire. L'intensité du marquage positif doit être évaluée dans le contexte de tout marquage de fond non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour tout essai immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté et non que l'antigène était absent dans les cellules/tissus testés. Si nécessaire, utilisez un panel d'anticorps pour identifier des réactions faussement négatives.

Note de mise en garde : Un marquage peut également être présent dans des cellules stromales, des cellules endothéliales, des lymphocytes et autres éléments de tissus. L'interprétation doit être évaluée dans le contexte de l'échantillon en cours d'évaluation.

Interprétation du test

Pour la détermination de l'expression du récepteur d'œstrogènes, seul un schéma de marquage nucléaire doit être évalué. Un pathologiste utilisant un microscope à fond clair doit réaliser l'évaluation des lames. Pour l'évaluation du marquage immunohistochimique et la cotation, un objectif d'un grossissement de 10x est approprié. Il convient d'utiliser un objectif d'un grossissement de 20-40x dans la conformation de la cote. Une coloration cytoplasmique doit être considérée comme une coloration non spécifique et ne doit pas être incluse dans l'évaluation.

Les lignes directrices de la société américaine d'oncologie clinique et du collège de pathologistes américains concernant les essais immunohistochimiques des récepteurs d'œstrogènes et de progestérone dans le cancer du sein [American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists

Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer] (Arch Pathol Lab Med. 2010; 134: e48–e72) doivent être utilisées pour l'interprétation du test.

Spécifiquement, l'évaluation est définie comme étant:

- Positive pour ER si l'on constate que ≥ 1 % des noyaux des cellules tumorales sont immunoréactifs.
- Négative pour ER si l'on constate que < 1 % des noyaux des cellules tumorales sont immunoréactifs en présence de preuves que l'échantillon peut exprimer ER (des contrôles intrinsèques positifs sont observés).
- Impossible à interpréter pour ER si l'on constate qu'aucun noyau tumoral n'est immunoréactif et que les éléments épithéliaux internes présents dans l'échantillon ou provenant du même échantillon et soumis séparément manquent de marquage nucléaire.

Dépannage

Contactez le service technique de Leica Biosystems: (800) 248-0123, Assistance technique aux États-Unis, pour signaler des résultats de coloration inhabituels.

Limites générales :

- L'immunohistochimie est un processus diagnostique en plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée à la sélection des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus; à la préparation de la lame IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.
- La coloration des tissus dépend de la manipulation et du traitement du tissu avant sa coloration. Le non-respect des procédures lors des opérations de fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage ou coupe, ou la contamination par d'autres tissus ou liquides risque d'entraîner des artefacts, un piégeage des anticorps ou des résultats faussement négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion à la paraffine, ou à des anomalies inhérentes au tissu⁵.
- Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre l'interprétation correcte des résultats.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être évaluée dans le contexte de la présentation clinique, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles internes et externes positifs et négatifs adéquats ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié qui connaît l'utilisation correcte des anticorps, réactifs et méthodes IHC d'interpréter toutes les étapes utilisées pour préparer et interpréter la préparation IHC finale.
- Le fabricant fournit ces anticorps/réactifs pour une utilisation à une dilution optimale en suivant les instructions fournies pour l'IHC sur des coupes de

tissu préparées. Tout écart des procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus annoncés ; des contrôles adéquats doivent être employés et documentés. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats de patient.

- Ce produit n'est pas destiné à être utilisé dans le cadre de la cytométrie de flux. Les caractéristiques de performances n'ont pas été déterminées pour la cytométrie de flux.
- Les tissus de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant un antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) peuvent présenter un marquage non spécifique à la peroxydase de raifort.
- Les réactifs peuvent avoir des réactions inattendues dans des tissus précédemment non testés. L'éventualité de réactions inattendues, même dans des groupes de tissus testés, ne peut pas être complètement écartée en raison de la variabilité biologique de l'expression antigénique dans les néoplasmes ou d'autres tissus pathologiques.
- Des sérums normaux ou non immuns de la même source animale que l'antisérum secondaire utilisé dans les opérations de blocage peuvent causer des résultats faussement négatifs ou faussement positifs dus aux auto-anticorps ou aux anticorps naturels.
- Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique de protéines ou de produits de réaction du substrat. Elles peuvent également être dues à une activité pseudo-péroxydase (érythrocytes), une activité peroxydase endogène (cytochrome C) ou à la biotine endogène (p. ex., foie, seins, cerveau, reins) suivant le type d'immunomarquage utilisé.

Limites spécifiques au produit

L'Estrogen Receptor Clone 6F11 a été optimisé chez Leica Biosystems. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats de patient dans ces circonstances. Les durées de protocole peuvent varier en raison de différences dans la fixation de tissu et de l'efficacité de l'amélioration de l'antigène, et doivent être déterminées de manière empirique. Des réactifs de contrôle négatifs doivent être utilisés lors de l'optimisation des conditions de récupération et des durées du protocole.

Caractéristiques de performances

Immunoréactivité

Tissus normaux

L'Estrogen Receptor Clone 6F11 détecte l'antigène du récepteur d'œstrogènes alpha (ER) dans les noyaux des cellules qui expriment des taux élevés de ER, une certaine proportion de cellules endométriales, ovariennes et myométriales et des cellules canalaire normales du sein. Un marquage peut également être présent dans des cellules stromales, des cellules endothéliales, des lymphocytes et autres éléments de tissus. Le tableau 1 contient un résumé de l'immunoréactivité ER avec le panel de tissus normaux recommandé.

Tableau 1 : Réactivité de l'Estrogen Receptor Clone 6F11 sur des tissus normaux

Tissu	Nombre de cas	Description du marquage	Intensité de marquage (0-3+)
Glande surrénale	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Cerveau, cervelet	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Cerveau, cerebrum	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Sein	5	Noyaux canalaire dans 4/5 tissus	1+
Col de l'utérus	3	Épithélium et muscle squameux	2+
Côlon	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Œsophage	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Cœur	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Rein	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Foie	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Poumon	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Cellules mésothéliales	1	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Ovaire	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Pancréas	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Nerf périphérique	2	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Hypophyse	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Prostate	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Glande salivaire/ submandibulaire	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Muscle squelettique	4	Aucun marquage des éléments de tissu	0

Peau	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Intestin grêle	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Rate	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Estomac	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Testicule	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Thymus	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Thyroïde	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Amygdale	4	Aucun marquage des éléments de tissu	0
Utérus	7	Glandes endométriales et cellules stromales dans 6/7 tissus	2+
Moelle osseuse	3	Aucun marquage des éléments de tissu	0

Clé indiquant l'intensité de marquage ; 0 – Négatif 1+ – Faible 2+ – Modéré 3+ – Fort

Étude des résultats cliniques

L'Estrogen Receptor Clone 6F11 a été testé dans une étude indépendante des résultats cliniques. En résumé, l'étude a utilisé une cohorte rétrospective de patients basés à Calgary (n=532) constituée de patients ayant reçu un diagnostic de cancer du sein entre 1985 et 2000 ; ces patients ont reçu un traitement adjuvant primaire par tamoxifène indépendamment de leur statut ER et PR. Cette cohorte possède plusieurs caractéristiques uniques qui renforcent cette étude, notamment : un suivi sur plus de 5 ans ; une augmentation du nombre d'événements pour accroître sa puissance statistique ; l'inclusion de patients ER négatifs pour éliminer le biais de sélection en matière de traitement.

Pour évaluer les différences entre les méthodes dans l'étude, les méthodes statistiques suivantes ont été évaluées et les résultats décrits :

1. La statistique Kappa de Cohen afin de quantifier la facilité de reproductibilité de la méthode de cotation d'Allred (Inter-observateurs et intra-observateur).

Les résultats ont indiqué que le kappa Inter-observateurs pour la plate-forme Leica a montré une concordance presque parfaite pour ER, avec $\kappa=0,67$ entre les Observateurs 1 et 2, $\kappa=0,75$ entre les Observateurs 1 et 3, et $\kappa=0,83$ entre les Observateurs 2 et 3. L'Observateur 1 a attribué une nouvelle cote aux lames trois mois après la cote initiale, et le kappa intra-observateur a été calculé avec une concordance presque parfaite, à savoir $\kappa=0,91$.

2. L'analyse de survie univariée de Kaplan-Meier et l'analyse de survie Multivariate Cox utilisant le seuil d'Allred pour la positivité du récepteur d'hormones afin de dichotomiser les patients en groupes de survie.

Le résultat univarié est montré dans la figure 1.

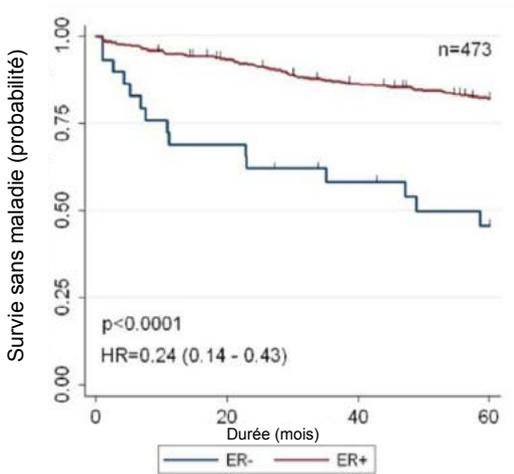


Figure 1 : Analyse univariée pour le dispositif de test Leica

Les modèles de Multivariate Cox ont été analysés ainsi que le statut des ganglions lymphatiques, le grade tumoral, la taille tumorale et le statut HER2. Le modèle est montré dans la figure 2.

	Dispositif Leica (n=363)		
	HR	95% CI	p-value
Statut ER	0,39	(0,19 – 0,78)	0,008
Statut de Ganglion lymphatique	3,18	(1,88 – 5,37)	<0,001
Grade tumoral	3,15	(1,84 – 5,38)	<0,001
Taille tumorale	1,67	(0,94 – 2,98)	0,083
Statut HER2	1,13	(0,38 – 3,33)	0,823

Figure 2 : Modèle multivarié pour le dispositif de test Leica

3. Les mesures des performances du test, la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN), ont été calculées. Pour ces calculs, l'analyse de la liaison des ligands (Ligand-Binding Assay, LBA) a été utilisée comme standard de référence (figure 3). On a également réalisé les calculs pour le test Leica et l'analyse LBA en utilisant la progression sous tamoxifène comme standard de référence (figure 4). Dans cette étude, les performances du test mesurées peuvent être définies ainsi:

La sensibilité est définie comme la proportion de sujets positifs identifiés correctement par le test.

La spécificité est définie comme la proportion de sujets négatifs identifiés correctement par le test.

La VPP est définie comme la proportion de sujets ayant un résultat de test positif et qui ont été diagnostiqués correctement.

La VPN est définie comme la proportion de sujets ayant un résultat de test négatif et qui ont été diagnostiqués correctement.

Les figures 3 et 4 montrent les résultats obtenus.

	Dispositif Leica
Sensibilité	0,97
Spécificité	0,44
VPP	0,96
VPN	0,70

Figure 3 : Mesure des performances du test (LBA = Standard de référence)

	Dispositif Leica	LBA
Sensibilité	0,96	0,96
Spécificité	0,16	0,16
VPP	0,82	0,84
VPN	0,52	0,44

Figure 4 : Mesure des performances du test (Progression = Standard de référence)

Les résultats de cette étude montrent que le dispositif de test, l'Estrogen Receptor Clone 6F11 a une corrélation excellente en matière d'identification du test clinique optimal permettant de déterminer la réponse thérapeutique endocrinienne dans le cancer du sein.

Étude de la reproductibilité

La reproductibilité a été réalisée sur le système BOND-III en utilisant des coupes de tissu en microréseau fixées au formol et enrobées de paraffine et des coupes de tissu entier de tumeur du sein invasive.

Résultats de la précision BOND-III

Étude de la précision dans une série (intra-essai - un seul instrument)

Les tests ont été effectués sur un SSA en utilisant 104 points de données de test avec l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, trois fois, sur trois jours différents.

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	79	0
	Négatif	0	25
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		100 (97,16-100,00)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		100 (96,28-100)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 (88,71-100)	

Étude de la précision au sein d'un instrument (inter-essais - un seul instrument)

Les tests ont été effectués sur trois SSA en utilisant 313 points de données de test avec l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, trois fois, sur trois jours différents.

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	236	1
	Négatif	0	76
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		99,68 (98,23-99,99)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		100 (98,74-100)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		98,70 (92,96-99,97)	

Étude de la précision entre séries (inter-essais - d'un jour à l'autre - un seul instrument)

Les tests ont été effectués sur un SSA en utilisant 175 points de données de test avec l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, cinq fois, sur cinq jours différents, réalisés sur une période de vingt (20) jours.

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	132	0
	Négatif	0	43
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		100 (98,30-100,00)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		100 (97,76-100)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 (93,27-100)	

Étude de la précision entre laboratoires (d'un site à l'autre - inter-essais - plusieurs instruments)

Les tests ont été effectués sur un SSA en utilisant 104 points de données de test avec l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, dans 3 sites d'investigation (Sites A, B et C).

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	78	0
	Négatif	0	26
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		100 (97,16-100,00)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		100 (96,23-100)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 (89,12-100)	

Étude de la précision d'un lot à l'autre

Les tests ont été effectués sur un SSA en utilisant 107 points de données de test avec l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™, en utilisant trois (3) lots de réactifs du dispositif de test fabriqués indépendamment.

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	80	0
	Négatif	0	27
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		100 (97,24-100,00)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		100 (96,32-100)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 (89,50-100)	

Étude de la précision entre observateurs

Les essais de la précision entre observateurs ont été évalués entre 3 observateurs dans 1 site d'investigation (Site A). Vingt (20) cas de cancer du sein (coupes entières) comprenant 5 cas de carcinome mammaire profil positif (expression de forte intensité), 5 cas de carcinome mammaire profil positif (expression d'intensité moyenne), 5 cas de carcinome mammaire profil positif (expression de faible intensité) et 5 cas de carcinome mammaire profil négatif ont été utilisés.

La concordance entre observateurs entre l'Observateur 1 et l'Observateur 2 était de 89,47 % (17/19). Un cas a été omis car l'Observateur 1 l'a signalé comme une tumeur invasive alors que l'Observateur 2 l'a signalé comme un carcinome canalaire in situ seulement, indiquant une différence dans le diagnostic primaire de cancer du sein.

La concordance entre observateurs entre l'Observateur 1 et l'Observateur 3 était de 94,74 % (18/19). Un cas a été omis car l'Observateur 1 l'a signalé comme une tumeur invasive alors que l'Observateur 2 l'a signalé comme un carcinome canalaire in situ seulement, indiquant une différence dans le diagnostic primaire de cancer du sein.

La concordance entre observateurs entre l'Observateur 2 et l'Observateur 3 était de 94,74 % (18/19). Un cas a été omis car les deux observateurs ont signalé un seul cas comme carcinome canalaire in situ seulement.

La concordance entre observateurs entre l'Observateur 1, l'Observateur 2 et l'Observateur 3 était de 96,49 % (55/57). Un cas a été omis car l'Observateur 1 l'a signalé comme une tumeur invasive alors que les Observateurs 2 et 3 l'ont signalé comme un carcinome canalaire in situ seulement, indiquant une différence dans le diagnostic primaire de cancer du sein.

Reproductibilité inter-sites

Les essais de la reproductibilité inter-sites de l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III ont été évalués dans 3 sites d'investigation sur des coupes de tissu entier. La cohorte du test portait sur 18 cas. Les essais ont été effectués sur une période de 5 jours non consécutifs, avec chaque site réalisant la colorisation d'un ensemble complet de cas chaque jour. Cela a donné 9 réplicats de 18 cas.

Les résultats pour la reproductibilité inter-sites sont présentés d'une manière globale (3 sites combinés), d'un site à l'autre (2 sites) et au niveau d'un seul site (intra-site).

Résultat global (3 sites combinés)

La concordance inter-sites entre le Site A, le Site B et le Site C était de 96,30 % (intervalle de confiance à 95 % de 92,11 % à 96,63 %) comme illustré dans le tableau ci-dessous.

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	111	0
	Négatif	6	45
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		96,30 % (92,11-98,63)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		94,87 % (89,17-98,10)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 % (93,56-100)	

La concordance inter-sites entre le Site A et le Site B était de 94,44 % (51/54).

La concordance inter-sites entre le Site A et le Site C était de 94,44 % (51/54).

La concordance inter-sites entre le Site B et le Site C était de 92,59 % (50/54).

La concordance au niveau du site pour le Site A seul était de 100 % (54/54).

La concordance au niveau du site pour le Site B seul était de 96,30 % (52/54).

La concordance au niveau du site pour le Site C seul était de 96,30 % (52/54).

Étude de la précision d'un lot à l'autre

Les essais de la reproductibilité d'un lot à l'autre de l'anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ ont été évalués dans un seul site d'investigation sur des coupes de tissu entier. La cohorte du test portait sur 18 cas. Les essais ont été réalisés en utilisant trois (3) lots de réactifs fabriqués indépendamment. Ce format a donné 3 réplicats de chaque lame (un pour chaque lot de réactifs).

		Positif	Négatif
Anticorps primaire sous forme de concentré liquide Estrogen Receptor Clone 6F11, Novocastra™ sur le système BOND-III	Positif	32	0
	Négatif	1	21
Pourcentage de concordance globale (IC à 95 %)		98,15 % (90,11-99,95)	
Pourcentage de concordance positive (IC à 95 %)		96,97 % (84,24-99,92)	
Pourcentage de concordance négative (IC à 95 %)		100 % (86,71-100)	

Immunoréactivité publiée

La caractérisation de l'Estrogen Receptor Clone 6F11 pendant le développement de l'anticorps a inclus une évaluation comparative d'une série de 55 carcinomes mammaires séquentiels. Les tissus évalués étaient des échantillons traités systématiquement, fixés au formol, enrobés de paraffine, et marqués en utilisant l'Estrogen Receptor Clone 6F11 et ER 1D5. On a observé une concordance au niveau du marquage entre l'Estrogen Receptor Clone 6F11 et ER 1D5 pour 50/55 cas¹.

Le statut de récepteur d'œstrogènes a été évalué dans 592 cas en utilisant des échantillons de tissu provenant de carcinomes mammaires primaires enrobés de paraffine et préparés systématiquement avec l'Estrogen Receptor Clone 6F11 et ER 1D5. Dans l'ensemble, 1D5 et l'Estrogen Receptor Clone 6F11 ont montré un taux de concordance de 97,5 %⁶.

Bibliographie

1. Bevitt DJ, Milton ID, Piggot N et al. New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry. *Journal of Pathology* 1997; 183(2), 228–232.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Omata M, Liew CT, 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.
6. Kaplan, P.A. et. al. 1D5 and 6F11 an immunohistochemical comparison of two monoclonal antibodies for the evaluation of estrogen receptor status in primary breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2005: 276–280.
7. Diaz L, Sahin A and Sneige N. Immunohistochemical detection of estrogen receptor in breast cancer: a laboratory quality improvement study. *United States and Canadian Academy of Pathology (Annual Meeting Abstracts March 22–28), 2003; 27A.*
8. Dabbs DJ, Landrenau RJ, Liu Y et al. Detection of estrogen receptor by immunohistochemistry in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(2), 403–405.
9. Khan SA, Yee KA, Kaplan C et al. Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time. *International Journal of Cancer* 2002; 102(4), 334–337.
10. Radzikowska E, Langfort R and Giedronowicz D. Estrogen and progesterone receptors in non small cell lung cancer patients. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 8(2), 69–73.
11. Leav I, Lau KM, Adams JY, et al. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *American Journal of Pathology* 2001; 159(1), 79–92.
12. Braidman IP Baris C, Selby PL et al. Preliminary report of impaired oestrogen receptor-alpha expression in bone, but no involvement of androgen receptor, in male idiopathic osteoporosis. *Journal of Pathology* 2000; 192, 90–96.
13. de las Mulas JM, van Niel M, Millan Y et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay. *Domest Anim Endocrinol* 2000; 18(1), 111–125.

14. Khan SA, Rogers MA, Khuruna KK et al. Oestrogen receptor expression in normal breast epithelium. *European Journal of Cancer* 2000; 36(Suppl 4), S27–S28.
15. Leake R, Barnes D, Pinder S et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *Journal of Clinical Pathology* 2000; 53(8), 634–635.
16. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E et al. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 2000; 37(6), 536–545.
17. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17(5), 1474–1481.

Modifications apportées à la publication précédente

Sans objet.

Légende des symboles

	Fabricant		Limitation en température		Concentration totale en protéines
	Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>		Numéro de lot		
	Lire les instructions d'utilisation		Date de péremption		

Date de publication

17 juin 2016

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242
Toll free: 0800 298 2344



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