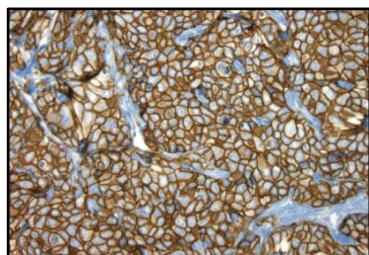


PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-2991

05278368001

IVD  50



Obr. 1. Barvení s protilátkou PATHWAY HER2 (4B5) u karcinomu prsu.

URČENÉ POUŽITÍ

PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5)) od společnosti Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) je králičí monoklonální protilátka určená k laboratornímu použití pro semikvantitativní detekci antigenu HER2 v řezech běžné a neoplastické tkáně fixované formalinem, zalité parafinem po obarvení na přístroji BenchMark XT

nebo BenchMark ULTRA. Je indikována jako pomůcka při hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u nichž se uvažuje o léčbě přípravkem Herceptin® (trastuzumab) nebo KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansin).

Tento produkt musí být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami. Tato protilátka je určena pro diagnostické použití *in vitro* (IVD).

Poznámka: Všichni pacienti v klinických studiích s přípravkem Herceptin byli vybráni s použitím testu klinické studie. Žádný z pacientů v těchto studiích nebyl vybrán s použitím PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5). PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) byla porovnána s primární protilátkou PATHWAY HER-2 (clone CB11) Primary Antibody na nezávislé sadě vzorků a bylo zjištěno, že poskytuje přijatelně shodné výsledky. Skutečná korelace PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) s klinickým výsledkem nebyla stanovena.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5)) je králičí monoklonální protilátka produkovaná proti vnitřní doméně transmembránového lidského receptoru epidermálního růstového faktoru 2 (HER2). HER2 byl klonován a charakterizován Akiyama, et al v roce 1986.¹ Ukázalo se, že klon 4B5 reaguje s 185kD proteinem z lyzátů buněk SK-BR-3 prostřednictvím Western blottingu. SK-BR-3 je buněčná linie karcinomu prsu, která má 128krát vyšší expresi mRNA HER2.² Velikost identifikovaného pásu dobře koreluje s velikostí uváděnou Akiyama, et al pro protein HER2 (185 kD).¹ Imunohistochemické (IHC) experimenty s transfektovanými buněčnými liniemi (HEK293) ukázaly, že klon 4B5 obarví buňky transfektované HER2 a buňky transfektované HER4. Nebylo pozorováno žádné barvení buněk transfektovaných HER1 nebo HER3. Data Western blotu s rekombinantním proteinem HER4 také ukázala, že klon 4B5 rozpoznává epitop HER4.

HER2 je přibližně 185kDa transmembránový tyrozinkinázový receptor, který je strukturálně podobný receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR).^{3,4} Genová amplifikace a odpovídající nadměrná exprese HER2 byla nalezena u řady nádorů, včetně karcinomu prsu.^{3,4,5} Nadměrná exprese proteinu je díky amplifikaci genu *HER2* primárním faktorem tumorigeneze zprostředkované HER2.³ Přebytek exprese proteinu HER2 na buněčné membráně zvyšuje signální transdukcii, která indukuje proliferaci a diferenciaci a nakonec způsobuje tvorbu nádoru.^{3,4}

Zhruba 15 až 30 procent invazivních ductálních karcinomů prsu je pozitivních na nadměrnou expresi proteinu HER2 a/nebo genovou amplifikaci.^{6,7} Téměř všechny případy Pagetovy choroby prsu a až 90 procent případů ductálního karcinomu *in situ* komedonového typu jsou pozitivní.^{6,8}

KLINICKÝ VÝZNAM

Rakovina prsu je nejčastějším karcinomem vyskytujícím se u žen a druhou nejčastější příčinou úmrtí souvisejících s rakovinou.^{4,6} V Severní Americe onemocní rakovinou prsu

jedna žena z osmi.⁴ Včasná detekce a vhodná terapie mohou významně ovlivnit celkovou přežití.^{9,10} Malé tkáňové vzorky lze snadno použít v rutinním IHC, což činí tuto techniku v kombinaci s protilátkami, které detekují antigeny důležité pro interpretaci karcinomu, účinným nástrojem pro patologa při diagnostice a prognóze onemocnění. Jedním z důležitých markerů rakoviny prsu je dnes HER2.^{11,12,13,14}

Bylo prokázáno, že terapeutické léky Herceptin (trastuzumab) a KADCYLA (ado-trastuzumab emtansin / trastuzumab emtansin) prospívají některým pacientům s karcinomem prsu tím, že zastaví a v některých případech zvrátí růst nádoru.^{9,14} Léky jsou humanizované monoklonální protilátky, které se vážou na protein HER2 na rakovinových buňkách.^{11,13,14} Léčba přípravkem Herceptin nebo KADCYLA by měla mít prospěch pouze u pacientů s karcinomy prsu pozitivními na HER2.^{11,12,13,14} Diagnostika *in vitro* pro hodnocení stavu HER2 u karcinomů prsu je důležitá a pomáhá klinickému lékaři při stanovení léčby přípravkem Herceptin nebo KADCYLA.^{11,12,14} Detekce exprese proteinu HER2 na základě IHC se používá jako pomůcka při hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u nichž se uvažuje o léčbě přípravkem Herceptin nebo KADCYLA.

Interpretace výsledků jakéhokoli detekčního systému pro HER2 musí brát v úvahu skutečnost, že HER2 je exprimován jak v rakovinových nádorech prsu, tak ve zdravé tkáni, i když na různých úrovních a s různými vzory exprese.¹⁵ Histologické tkáňové přípravy mají výhodu intaktní morfologie tkáně, která pomáhá při interpretaci pozitivní vzorku na HER2. Všechny histologické testy by měly být interpretovány odborníkem na morfologii rakoviny prsu a/nebo na patologii a výsledky by měly být doplněny morfologickými studii a vhodnými kontrolami a použity ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními údaji.

PRINCIP POSTUPU

Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) je králičí monoklonální protilátka, která se váže na HER2 v řezech tkáně fixované formalinem, zalité parafinem (FFPE). Specifická protilátka může být lokalizována buď formulací sekundární protilátky konjugované s biotinem, která rozpoznává králičí imunoglobuliny, s následným přidáním konjugátu streptavidin-křenové peroxidázy (HRP) (VIEW DAB Detection Kit) anebo konjugátu sekundární protilátky aHRP (ultraView Universal DAB Detection Kit). Specifický komplex protilátky a enzymu je poté vizualizován produktem precipitační enzymové reakce. Každý krok se inkubuje po přesnou dobu a při přesné teplotě. Na konci každého kroku inkubace jsou fezy promyty v přístroji pro zastavení reakce a odstranění nenavázaného materiálu, který by bránil požadované reakci v následných krocích. Přístroj nanese kapalné krycí skličko, které minimalizuje odpařování vodných reagentů ze sklička se vzorkem.

Klinické případy by měly být hodnoceny v kontextu výkonu příslušných kontrol. Doporučuje se zahrnout pozitivní kontrolu tkáně fixovanou a zpracovanou stejným způsobem jako pacientský vzorek (například slabě pozitivní karcinom prsu). Kromě obarvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) by mělo být provedeno obarvení druhého sklička s CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby byl test považován za platný, měla by tkáň pro pozitivní kontrolu vykazovat barvení membrány nádorových buněk. Tyto složky by měly být negativní, pokud jsou barveny s CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Kromě toho se doporučuje, aby bylo pro každou dávku vzorků zpracovaných a analyzovaných na přístroji BenchMark IHC/ISH zahrnuto skličko s negativní kontrolní tkání (například karcinom prsu negativní na HER2). Tato negativní kontrolní tkáň by měla být obarvena s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5), aby bylo zajištěno, že zesílení antigenu a další postupy před ošetřením nevytvorí falešně pozitivní barvení. Použití předem naředěné protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) společnosti VENTANA a VIEW DAB připraveného k použití a soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit společně s přístrojem BenchMark IHC/ISH snižuje možnost lidské chyby a nevyhnutelné variability vyplývající z ředění jednotlivých reagentů, manuálního pipetování a manuální aplikace reagentů.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) obsahuje dostatečné množství reagentů pro 50 testů.

Jeden 5mL dávkovač protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) obsahuje přibližně 30 µg králičí monoklonální protilátky namířené proti lidskému antigenu HER2.

Protilátka je naředěna ve fyziologickém roztoku s 0.05 M pufru Tris, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 s obsahem 0.3 % nosičového proteinu a 0.05 % azidu sodného jako konzervačního prostředku. V zásobním roztoku je stopové množství, přibližně 0.25 %, fetálního telecího séra.

Koncentrace specifické protilátky je přibližně 6 µg/mL.

Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) je králičí IgG zředěný ze supematantů tkáňové kultury.

Podrobné popisy následujících položek naleznete v příslušném metodickém listu v detekční soupravě VENTANA: Princip postupu, Materiál a metody, Odběr vzorků a příprava pro analýzu, Postupy kontroly kvality, Řešení problémů, Interpretace výsledků a Omezení.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvicí reagentie, například detekční soupravy VENTANA, a pomocné materiály, včetně sklíček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obráťte se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály mohou být při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky:

1. Doporučené kontrolní tkáně
2. Mikroskopická sklíčka, Superfrost Plus (VWR kat. č. 48311-703 nebo ekvivalent)
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. č. 760-1029 / 05266238001)
4. Detekční souprava VIEW DAB Detection Kit (kat. č. 760-091 / 05266157001)
5. *ultra*View Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
14. Trvalé fixační médium
15. Krycí sklo
16. Automatizovaný podavač krycích sklíček
17. Obecné laboratorní vybavení
18. Přístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitím uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve vodorovné poloze do chladničky.

Každý dávkovač protilátky má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentii nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístrojem BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně FFPE zpracované běžným způsobem. V zájmu zachování antigenosti nařezaných tkáňových řezů se musejí sklíčka barvit okamžitě.

Doporučeným fixativem na tkáně je 10% neutrální pufovaný formalin.¹⁶ Použité množství je 15- až 20krát větší než objem tkáně. Žádný fixační prostředek nepronikne za 24 hodin více než 2 až 3 mm pevné tkáně nebo 5 mm porézní tkáně. Řez tkáně o velikosti 3 mm nebo menší by měl být fixován nejméně 4 hodiny a nejvýše 8 hodin. Fixaci lze provádět při pokojové teplotě (15–25 °C).¹⁶

Správně fixované a zalité tkáně exprimující antigen zůstanou stabilní minimálně 2 roky, pokud jsou uchovávány na chladném místě (15–25 °C). Norma Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) z roku 1988, 42 CFR 493.1259(b) vyžaduje, že „laboratoř musí uchovávat obarvená sklíčka nejméně deset let od data vyšetření a uchovávat bloky vzorků nejméně dva roky od data vyšetření“.

Je třeba připravit řezy o tloušťce přibližně 5 µm a ty položit na sklíčka. Sklíčka by měla být Superfrost Plus nebo ekvivalentní. Tkáň by měla být sušena na vzduchu uložením sklíček při pokojové teplotě přes noc.¹⁷ Studie provedené ve společnosti Ventana naznačují, že řezy tkáně a buněčné linie sušené na vzduchu a poté skladované při teplotě 2–8 °C jsou stabilní po dobu nejméně 6 měsíců. Každá laboratoř má validovat stabilitu sklíčka s řezem pro své vlastní postupy a podmínky prostředí pro skladování.

Vyšetření neznámých vzorků doporučujeme provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).

2. Pouze k odbornému použití.
3. **UPOZORNĚNÍ:** Federální zákony USA omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku. (Rx Only)
4. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
5. Pozitivně nabitá sklíčka mohou být citlivá na zátěž prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy sklíček.
6. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrnici odpovědných orgánů.^{18,19}
7. Zabraňte kontaktu reagentii s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentii, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
9. Při použití podle pokynů není tento produkt klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervačním prostředkem v reagentii je azid sodný. Symptomy nadměrné expozice azidu sodnému mohou zahrnovat podráždění kůže a očí, podráždění sliznic a podráždění horních cest dýchacích. Koncentrace azidu sodného v tomto produktu je menší než 0.05 % a nesplňuje kritéria pro nebezpečnou látku. Usazeniny NaN₃ mohou reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody, aby nedocházelo ke hromadění azidu v potrubí.²⁰ U citlivých jedinců jsou možné systémové alergické reakce.
10. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách dialog.roche.com.
11. Doporučené metody likvidace naleznete v celostátních a/nebo místních předpisech.
12. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
13. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

POSTUP BARVENÍ

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty pro použití v přístrojích BenchMark IHC/ISH společně s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Doporučené barvicí protokoly uvádějí tabulky níže. Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) je schválena pro použití ve Spojených státech amerických, pokud se používá postup barvení PATHWAY pro doporučené barvicí protokoly.

Tato protilátka byla optimalizována pro specifické inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagentie ověřit Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) by měla být před použitím ponechána stát alespoň 30 minut při pokojové teplotě.

Parametry automatických procesů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Další podrobné informace o postupech IHC barvení naleznete v metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkladacímu dávkovači (P/N 790-2991).

Tab. 1. Doporučený barvicí protokol pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekční soupravou VIEW DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark	XT	ULTRA
Sušení	Žádné	Žádné	Žádné
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	CC1, ¹¹ standardní	CC1, ¹¹ standardní	ULTRA CC1, mírné
Protilátka (primární)	32 minut, 37 °C	32 minut, 37 °C	24 minut, 36 °C
Blokování A/B (blokování biotinu)	Požadováno		

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark	XT	ULTRA
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH s použitím postupu barvení PATHWAY.

Typ postupu	Metoda	
	XT	ULTRA
Postup barvení:	XT <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5	U <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	CC1, mírné	ULTRA CC1, mírné
Enzym (proteáza)	Nepožaduje se	Nepožaduje se
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty	
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	

Tab. 3. Doporučený barvicí protokol pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH s použitím postupu barvení *ultraView*.

Typ postupu	Metoda	
	XT	ULTRA
Postup barvení:	XT <i>ultraView</i> v3	U <i>ultraView</i> DAB
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, mírné	ULTRA CC1, mírné
Enzym (proteáza)	Nepožaduje se	Nepožaduje se
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Zvoleno	Zvoleno
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty	
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protilátkou, dobu úpravy buněk nebo dobu předběžného zpracování proteázou v závislosti na jednotlivých vzorcích, použité metodě detekce a vlastní preferenci. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).²¹

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné skličko jako testovanou tkáň. Při nanášení reagentie na skličko pak lze snáze zjistit případné závady. Pro kontrolu kvality je nejvhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením. Kontrolní tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené prvky a sloužit pro

pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkáň by měl být čerstvý vzorek z pitvy, biopsie nebo operace, zpracovaný a fixovaný co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Známé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce reagentií a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy testovaných vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Příklady tkání pro pozitivní kontrolu pro tuto protilátku jsou tkáně slabě pozitivního karcinomu prsu.

Kontroly systému buněčné linie

Společnost Ventana má k dispozici jako samostatný produkt čtyři kontroly řady buněk fixované formalínem, zalité parafínem, nařezané a umístěné na jedno nabitě skličko (P/N 781-2991). Kontrolní sklička PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides mohou být užitečná při předběžné validaci metody zpracování použité pro barvení skliček s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Tyto čtyři kontroly řady buněk jsou charakterizovány hybridizací in situ pro počet kopií genů, Tab. 4. Pokud jsou řádně zpracovány a obarveny, měly by se buněčné linie obarvit tak, jak je popsáno v metodickém listu pro kontrolní sklička PATHWAY Her-2 4 in 1 Control Slides. Pokud uvedené barvení není u příslušných jader patrné, zejména u kontrol 1+ a 2+, mělo by se barvení tkání opakovat.

Tab. 4. Vlastnosti kontrolních skliček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

IHC skóre pro HER2	Buněčná linie	Poměr HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

*Poměr HER2/Chr17 je průměr ze tří šarží kontrolních skliček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides stanovený pomocí fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Pozitivní kontrola tkáně

Tkáň pro pozitivní kontrolu, fixovaná a zpracovaná stejným způsobem jako patientské vzorky, musí být analyzována pro každou sadu podmínek testu a při každém provedeném postupu barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Tato tkáň by mohla obsahovat buňky anebo složky tkáně s pozitivním zbarvením i negativní buňky anebo složky tkáně a může sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkáň by měl být čerstvý vzorek z pitvy/biopsie/operace, zpracovaný a fixovaný co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy. Taková tkáň může sledovat všechny kroky analýzy, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného odlišně od testovaného vzorku poskytuje kontrolu všech reagentií a kroků metody kromě fixace a přípravy tkáně. Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je pro optimální kontrolu kvality a pro detekci menších úrovní degradace reagentií vhodnější než tkáň se silným pozitivním zbarvením. V ideálním případě by měla být vybrána tkáň, o které je známo, že má slabé, ale pozitivní zbarvení, aby se potvrdilo, že je systém citlivý i na nízké míry degradace reagentií či na problémy s metodikou IHC. Obecně je však neoplastická tkáň, která je pozitivní na HER2, silně pozitivní vzhledem k povaze patologie (nadměrná exprese). Příkladem pozitivní kontroly pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) je invazivní karcinom prsu (například duktální nebo lobulární) se známou slabou pozitivitou na HER2. Složky tkáně s pozitivním zbarvením (membrána neoplastických buněk) se používají k potvrzení, že byla použita protilátka a že přístroj správně fungoval.

Tkáň invazivního karcinomu prsu se známou slabou pozitivitou na HER2 může obsahovat buňky nebo složky tkáně s pozitivním i negativním zbarvením a může sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu.

Známé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentií, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy patientských vzorků.

Negativní kontrola tkáně

Stejně skličko s tkání použitou pro pozitivní kontrolu tkáně (duktální nebo lobulární invazivní karcinom prsu) může být použito jako negativní kontrola tkáně. Složky bez zbarvení (okolní stroma, lymfoidní buňky a krevní cévy) by měly vykazovat nepřítomnost specifického barvení a poskytnout indikaci specifického barvení pozadí s primární protilátkou. S každým barvicím cyklem použijte tkáň, o které je známo, že je fixována, zpracována a zalita identickým způsobem jako patientský (patientské) vzorek (vzorky),

abyste ověřili specificko protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a abyste poskytli indikaci specifického zbarvení pozadí (falešně pozitivní zbarvení).

Negativní reagenční kontrola

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s negativní reagenční kontrolou. Negativní reagenční kontrola se používá namísto primární protilátky k vyhodnocení nespecifického zbarvení. Sklíčko má být zbarveno s CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Doba inkubace pro negativní reagenční kontrolu by měla být stejná jako u inkubace s primární protilátkou.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách je třeba neprodleně nahlásit na vaše místní servisní zastoupení. Pokud výsledky kontroly kvality nesplňují specifikace, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů. Identifikujte a napravte problém a pak opakujte patientské vzorky.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře je třeba ověřit specificko protilátky jejím testováním na řadě tkání se známými imunohistochemickými funkčními charakteristikami reprezentujícími známé pozitivní a negativní tkáně (viz Postupy kontroly kvality uvedené v této části v příbalové informaci a doporučení College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²² nebo CLSI Approved Guideline²³ nebo oba dokumenty). Postupy kontroly kvality je třeba opakovat pro každou novou šarži protilátky nebo vždy, když dojde ke změně parametru testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně rakoviny prsu se známým stavem HER2.

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Imunologický postup automatizovaného barvení VENTANA způsobí, že se hnědý reakční produkt (DAB) vysráží v místech antigenu lokalizovaných protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Kvalifikovaný patolog se zkušenostmi s imunohistochemickými postupy musí před interpretací výsledků nejprve vyhodnotit kontroly a posoudit obarvený produkt.

Pozitivní kontroly

Nejprve by měla být vyšetřena zbarvená pozitivní kontrola tkáně, aby se zjistilo, zda všechny reagenty fungují správně. Přítomnost patřičně zbarveného reakčního produktu v membráně cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. Podle délky inkubace a síly použitého hematoxylinu bude výsledkem kontrastního barvení světlemodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní zbarvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Pokud pozitivní kontrolní tkáň pozitivně zbarvená nevykazuje, je třeba považovat veškeré výsledky u testovaných vzorků za neplatné.

Negativní kontroly tkáně

Pro pozitivní kontrolu tkáně by měla být vyšetřena negativní kontrola tkáně, aby se ověřilo specifické značení cílového antigenu primární protilátkou. Absence specifického zbarvení v negativní kontrolu tkáně potvrzuje nedostatek křížové reaktivity protilátky s buňkami nebo buněčnými složkami. Pokud je tkáň kontrastně nabarvena, může dojít k obarvení kolem vnější buňky, tj. intersticiálních prostorů. Dojde-li ke specifickému zbarvení u negativní kontroly tkáně, měly by být výsledky u patientského vzorku považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontroly

Nespecifické zbarvení, pokud je přítomno, bude mít rozptýlený vzhled. V tkáňových řezech, které jsou nadměrně fixovány formalinem, lze rovněž pozorovat sporadické lehké zbarvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků zbarvení je třeba používat pouze intaktní buňky, jelikož nekrotické nebo degenerované buňky často barví nespecificky.

Tkáň pacienta

Patientské vzorky by měly být vyšetřeny jako poslední. Intenzita pozitivního zbarvení by měla být hodnocena v kontextu jakéhokoli zbarvení pozadí u negativní reagenční kontroly. Stejně jako u jiných imunohistochemických testů, negativní výsledek znamená, že nebyl detekován dotýčný antigen, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen. Při interpretaci jakéhokoliv imunohistochemického výsledku by měla být také vyšetřena morfologie jednotlivých tkáňových vzorků za použití řezu zbarveného hematoxylinem a eosinem. Morfologické nálezy u pacienta a příslušná klinická data musejí být interpretovány kvalifikovaným patologem.

Kvalifikovaný patolog se zkušenostmi s imunohistochemickými postupy musí před interpretací výsledků nejprve vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly a posoudit obarvený produkt.

Konvence při hodnocení pro interpretaci výsledků u protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) Antibody

Karcinomy prsu, které jsou považovány za pozitivní na nadměrnou expresi proteinu HER2, musejí splňovat prahová kritéria pro intenzitu zbarvení (2+ nebo vyšší na stupnici od 0 do 3+) a procento pozitivních nádorových buněk (více než 10 %). Zbarvení musí také lokalizovat buněčnou membránu. Stále může být přítomno cytoplazmatické zbarvení, ale toto zbarvení není do stanovení pozitivnosti zahrnuto. Dobře zachovaná a dobře obarvená oblast tkáně by měla být vyšetřena z hlediska intenzity zbarvení a stanovení úplnosti zbarvení membrány. Zbarvení, které zcela obklopuje cytoplazmatickou membránu, by mělo být hodnoceno jako s intenzitou „2+“ nebo „3+“. Částečné zbarvení membrány by mělo být hodnoceno jako „1+“. Může být nutné prošetřit hraniční případy při 40násobném nebo větším zvětšení, aby se rozlišilo mezi intenzitami „1+“ a „2+“. Na rozdíl od případů hodnocených jako intenzita 3+ má zbarvení hodnocené jako 2+ ostřejší a jasněji vymezený kruh, zatímco případy hodnocené jako 3+ vykazují velmi silný obrys. Níže je uveden rychlý referenční přehled kritérií zbarvení, Tab. 5. Podrobnější popis s fotografiemi zbarvení protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) naleznete v příručce pro interpretaci výsledků u protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Tab. 5. Kritéria pro intenzitu a vzor zbarvení buněčných membrán s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Vzor zbarvení	Skóre (hlášení ošetřujícímu lékaři)	Hodnocení obarvení HER2
Nebylo pozorováno žádné zbarvení membrány	0	Negativní
Slabé, částečné zbarvení membrány v jakémkoli podílu rakovinných buněk	1+	Negativní
Slabé úplné zbarvení membrány, více než 10 % rakovinných buněk	2+	Slabě pozitivní *
Intenzivní úplné zbarvení membrány, více než 10 % rakovinných buněk	3+	Pozitivní

* Doporučen reflex na ISH

OMEZENÍ

Obecná omezení

- Imunohistochemie je víceúrovňový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentů, výběru tkání, fixace, zpracování, v přípravě imunohistochemického sklíčka a v interpretaci výsledků zbarvení.
- Zbarvení tkáně závisí na zacházení s tkání a jejím zpracování před zbarvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi či tekutinami mohou způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek metod fixace a zalévání nebo z inherentních nepravdivostí v tkáni.
- Nadměrné nebo neúplné kontrastní zbarvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
- Klinická interpretace pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfologie a dalších histopatologických kritérií. Klinický výklad jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněn morfologickými studii a vhodnými kontrolami, jakož i dalšími diagnostickými testy. Je odpovědností kvalifikovaného patologa seznámit se s protilátkami, reagenty a metodami používanými k interpretaci obarveného přípravku. Zbarvení musí být prováděno v certifikované a licencované laboratoři pod dohledem patologa, který je odpovědný za kontrolu obarvených sklíčků a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Společnost VENTANA poskytuje protilátky a reagenty v optimálním ředění pro použití, pokud jsou dodrženy uvedené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může očekávané výsledky zneplatnit. Musejí být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.

- Tento produkt není určen k použití v průtokové cytometrii, funkční charakteristiky nebyly stanoveny.
- Reagencie mohou v dřívě netestovaných tkáních vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávaných reakcí nelze zcela vyloučit ani u testovaných skupin tkání, a to z důvodu biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních.²⁴ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní servisní zastoupení.
- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahujících povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické zbarvení s křenovou peroxidázou.²⁵
- Falešně pozitivní výsledky lze pozorovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce substrátu. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty), aktivitou endogenní peroxidázy (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (například: játra, mozek, prsa, ledviny) v závislosti na typu použitého imunologického barvení.²⁶
- Stejně jako u jiných imunohistochemických testů, negativní výsledek znamená, že nebyl detekován antigen, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

Tato protilátka byla optimalizována, jak je uvedeno v Tab. 1, Tab. 2 a Tab. 3, pro přístroje BenchMark IHC/ISH a detekční chemizmy. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace primární protilátky pro individuální vzorky. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“.²¹

Protilátka v kombinaci s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežije rutinní fixaci formalinem, zpracování tkání a řezání. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci a validaci výsledků u pacientů.

Sklička by měla být obarvena okamžitě, protože antigennost připravených tkáňových řezů se může v průběhu času snižovat a během dlouhodobého skladování může být ohrožena vlivy prostředí.

Všechny testy nemusí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Niže jsou uvedeny výsledky provedených testů barvení týkajících se senzitivity, specifity a preciznosti.

Senzitivita a specifita

Senzitivita/specifita protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) byla stanovena studií, která pro většinu běžných tkání neprokázala žádné specifické zbarvení membrány. Výsledky barvení jsou uvedeny v Tab. 6. Senzitivita/specifita protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) byla stanovena studií, která pro většinu neoplastických tkání neprokázala žádné specifické zbarvení membrány. Výsledky barvení jsou uvedeny v Tab. 7. Barvení pro specifitu a senzitivitu bylo provedeno pomocí protokolu VUEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT, případně protokolu *ultraView* na výše uvedeném přístroji BenchMark ULTRA.

Pozitivní barvení v epitelu mandlí, ezofageálním epitelu, prostatě, periferním nervu, příštítných těliscích, rakovině prsu, tlustého střeva a vaječnicků je v souladu s publikovanou literaturou týkající se exprese HER2.

Senzitivita závisí na uchování antigenu. Jakákoli nesprávná manipulace s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo skladování, která mění antigennost, oslabuje detekci proteinu HER2 pomocí protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a může generovat falešně negativní výsledky.

Tab. 6. Senzitivita/specifita protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) byla stanovena testováním běžných tkání FFPE.

Tkáň	Počet pozitivních případů/celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů/celkový počet případů
Velký mozek	0/6	Tenké střevo	0/6

Tkáň	Počet pozitivních případů/celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů/celkový počet případů
Mozeček	0/6	Tlusté střevo	0/46
Nadledvinka	0/6	Játra	0/6
Vaječník	0/6	Slinná žláza	0/3
Slinivka	0/6	Jazyk	0/3
Lymfatická uzlina	0/12	Ledvina	0/6
Hypofýza	0/5	Prostata	1/6
Varle	0/6	Močový měchýř ^b	3/3
Štítná žláza	0/6	Konečník	0/6
Prs	0/14	Příštítné tělísko ^c	4/6
Slezina	0/6	Endometrium	0/3
Mandle ^a	3/6	Děloha	0/3
Brzlík	0/5	Děložní hrdlo	0/5
Kostní dřev	0/3	Endocervix	0/1
Plice	0/6	Kosterní sval	0/6
Srdce	0/5	Kůže	0/6
Perikard	0/3	Nerv	2/6
Jícen	1/6	Mezotel	0/3
Žaludek	0/11		

^a fokální barvení povrchových epitelových buněk

^b membránové zbarvení povrchových deštníkových buněk

^c fokální barvení membrány

Tab. 7. Senzitivita/specifita protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) byla stanovena testováním řady neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů/celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	0/2
Meningiom (mozek)	0/1
Oligodendrogliom (mozek)	0/1
Serózní adenokarcinom (vaječník)	0/2
Karcinom, jinak neurčený (NOS) (vaječník)	1/2
Neuroendokrinní novotvar (slinivka)	0/1
Adenokarcinom (slinivka)	0/1
Karcinom NOS (slinivka)	0/3
Seminom (varle)	0/1
Embryonální karcinom (varle)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů/celkový počet případů
Medulární karcinom (štítná žláza)	0/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	0/1
Karcinom, NOS (štítná žláza)	0/3
Mikroinvazivní duktální karcinom (prs)	2/2
Invazivní duktální karcinom (prs)	42/99
Karcinom NOS (prs)	1/4
Malobuněčný karcinom (plíce)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	0/1
Adenokarcinom (plíce)	0/1
Karcinom, NOS (plíce)	0/2
Karcinom ze skvamózních buněk (jícen)	0/1
Adenokarcinom (jícen)	0/1
Mucinózní adenokarcinom (žaludek)	0/4
Adenokarcinom (žaludek)	8/88
Karcinom z prstenčitých buněk (žaludek)	0/4
Karcinom, NOS (žaludek)	0/3
Adenokarcinom (tenké střevo)	0/1
Gastrointestinální stromální tumor (tenké střevo)	0/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	0/32
Gastrointestinální stromální tumor (tlusté střevo)	0/1
Karcinom, NOS (tlusté střevo)	1/3
Adenokarcinom (konečník)	1/5
Gastrointestinální stromální tumor (konečník)	0/1
Melanom (konečník)	0/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	0/3
Hepatoblastom (játra)	0/1
Karcinom, NOS (játra)	0/3
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	0/1
Karcinom, NOS (ledvina)	0/5
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Karcinom, NOS (prostata)	0/3
Leiomyom (děloha)	0/1
Adenokarcinom (děloha)	0/1
Karcinom z jasných buněk (děloha)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čipek)	0/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčné pruhovaný sval)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů/celkový počet případů
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	1/1
Neurofibrom (lumbální)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mezoteliom (peritoneum)	0/1
Pleomorfní rhabdomyosarkom (peritoneum)	0/1
Lymfom, NOS	0/3
Lymfom z B-buněk, NOS (slezina)	0/1
Lymfom z B-buněk, NOS (lymfatická uzlina)	0/2
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	0/1
Uroteliální karcinom (močový měchýř)	1/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	0/1
Osteosarkom (kost)	0/1
Leiomyosarkom (hladký sval)	0/1
Adenokarcinom konečníku (metastatický)	0/1
Adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	0/7
Mucinózní adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	0/1
Neuroendokrinní neoplasmus, NOS	0/2
Leiomyom	0/2
Melanom	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Nediferencovaný karcinom, NOS	0/1

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Studie opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti

Reprodukovatelnost barvení v rámci cyklu na přístroji BenchMark XT byla stanovena barvením tří sklíček, každé z pěti tkání rakoviny prsu se skóre exprese HER-2 0, 1+, 2+ a 3+. Pro každý případ byla tři ze 3 sklíček náležitě obarvena v rámci cyklu a pro všechny testované přístroje. Uživatelé by měli ověřit reprodukovatelnost výsledků v rámci cyklu barvením několika sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jednom cyklu.

Reprodukovatelnost barvení mezi cykly a mezi platformami byla stanovena barvením tří sklíček, každé z pěti tkání rakoviny prsu se skóre exprese HER-2 0, 1+, 2+ a 3+ při třech různých přístrojových cyklech na přístroji BenchMark XT. V každém případě bylo během tří cyklů přístroje a napříč všemi testovanými přístroji náležitě obarveno 9 z 9 sklíček. Uživatelé by měli ověřit reprodukovatelnost výsledků mezi cykly barvením několika sad sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v různých dnech.

Reprodukovatelnost mezi šaržemi

Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla stanovena automatickým barvením 5 tkání rakoviny prsu se skóre exprese HER-2 0, 1+, 2+ a 3+ pomocí 3 šarží protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5). Obarvené tkáně byly hodnoceny na stupnici od 0 do 3+ třemi kvalifikovanými hodnotiteli. Mezi šaržemi a hodnotiteli došlo k 100% shodě pro 3 sklíčka a 5 obarvených tkání.

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi a mezi hodnotiteli na přístroji BenchMark XT

Mezilaboratorní barvení na přístroji BenchMark XT a reprodukovatelnost hodnocení mezi hodnotiteli: Mezilaboratorní studie reprodukovatelnosti se zúčastnily tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech amerických. Sklíčka s řezy ze 40 případů invazivního karcinomu prsu fixovaných neutrálním pufovaným formalinem [10 z každé kategorie HER-2 (0-1+, 2+, 3+)] a šest (6) kontrolních sklíček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides byla odeslána na jednotlivá pracoviště pro barvení na přístroji BenchMark XT pomocí doporučeného barvicího protokolu. Kontroly zahrnovaly PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého případu obarvené reagenty negativní na Ig. Na základě provedení kontrol bylo zjištěno, že na žádném pracovišti neproběhl žádný neplatný cyklus. Výsledky byly analyzovány společností Ventana. Třicet čtyři ze čtyřiceti (34/40) sklíček vykazovalo napříč pracovišti, kde barvení probíhalo, podobnou intenzitu barvení. Šest vzorků (6/40 neboli 15 %) se lišilo maximálně o 1 úroveň intenzity. Tři (3/6) vzorky kolísaly mezi 0 a 1+, což jsou skóre, která jsou obě považována za negativní. Dva vzorky (2/40 nebo 5 %) se pohybovaly mezi 2+ a 3+ a jeden vzorek (1/40) se pohyboval mezi 1+ a 2+. Ve všech 40 případech (100 %) se shodli minimálně 2 ze 3 patologů.

Funkční charakteristiky na přístroji BenchMark ULTRA s použitím detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit.

Mezilaboratorní barvení a reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny na přístroji BenchMark ULTRA

Mezilaboratorní studie reprodukovatelnosti se zúčastnily tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech amerických. Sklíčka s řezy ze 48 případů invazivního karcinomu prsu FFPE [12 z každé kategorie HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] a 1 pár kontrolních sklíček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides na každý z 12 barvicích cyklů byly rozděleny na pracoviště, kde probíhala studie, pro barvení na přístroji BenchMark ULTRA s použitím doporučeného barvicího protokolu a detekční soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly kontrolní sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Controls Slides a druhé sklíčko každého případu obarvené reagenty negativní Ig. Patologové, kteří neznali stav případu, vyhodnotili sklíčka a poskytli klinické skóre (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky byly analyzovány společností Ventana. Za použití standardní nomenklatury pro tabulky 2x2 byla průměrná pozitivní shoda (APA) napříč pracovišti vypočítána jako $[2a / (2a + b + c)]$ a průměrná negativní shoda (ANA) byla vypočítána jako $[2d / (2d + b + c)]$. Napříč všemi pracovišti byla APA mezi pracovišti na základě klinického hodnocení (pozitivní, negativní) 90,0 % (108/120) a ANA byla 92,9 % (156/168). U párového srovnání pracovišť byla APA vypočítána jako $a / (a + c)$ a ANA byla vypočítána jako $d / (b + d)$. Míra APA mezi pracovišti byla 93,0 % (40/43), 87,2 % (34/39) a 89,5 % (34/38) pro pracoviště A vs. B, pracoviště A vs. C, respektive pracoviště B vs. C. Míra ANA mezi pracovišti byla 94,3 % (50/53), 91,2 % (52/57) a 93,1 % (54/58) pro pracoviště A vs. B, pracoviště A vs. C, respektive pracoviště B vs. C.

Následující Tab. 8, Tab. 9 a Tab. 10 jsou 3x3 prezentace výsledků pro jednotlivé hodnotitele na základě klinického skóre, kde byla oddělena skóre 2+ a 3+:

Tab. 8. Analýza 3x3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm A a pracovištěm B – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracoviště A	Pracoviště B			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Celkem	12	9	27	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)			43/48 (89.6)	

Tab. 9. Analýza 3x3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm A a pracovištěm C – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracoviště A	Pracoviště C			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Celkem	12	5	31	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)			42/48 (87.5)	

Tab. 10. Analýza 3x3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm B a pracovištěm C – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracoviště B	Pracoviště C			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Celkem	12	5	31	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)			44/48 (91.7)	

Reprodukovatelnost barvení mezi jednotlivými na přístroji BenchMark ULTRA

Část studie týkající se reprodukovatelnosti mezi jednotlivými dny (IDR) zahrnovala 12 případů se zamýšlenou distribucí přibližně tří (3) případů v každém klinickém skóre (0, 1+, 2+, 3+). Celkem pět cyklů na přístroji BenchMark ULTRA v jedné instituci (pracoviště C) provádějící IDR část studie proběhlo během období minimálně 20 dnů tak, aby žádné dva dny barvení nenásledovaly po sobě. Míry APA a ANA pro IDR založené na klinickém hodnocení barvení protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na pracovišti C po všechny dny byly 100 %. Míry celkové procentuální shody (OPA) pro srovnání mezi jednotlivými dny na základě klinických skóre byly 100 % pro každé ze srovnání mezi dny i pro všechny dny dohromady.

Srovnávací studie pro přístroje BenchMark ULTRA a BenchMark XT

Studie srovnávání platformem se zúčastnily dvě laboratoře provádějící barvení a tři pracoviště provádějící odečítání ve Spojených státech amerických. Sklíčka s řezy z 280 případů invazivního karcinomu prsu FFPE [přibližně 70 případů z každé kategorie HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] byla náhodně rozdělena na dvě pracoviště provádějící barvení (140 případů na každé pracoviště) pro barvení na přístroji BenchMark XT a přístroji BenchMark ULTRA s použitím příslušných doporučených barvicích protokolů a detekční soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly kontrolní sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Controls Slides a druhé sklíčko každého případu obarvené reagenty negativní Ig. Obarvené případy z pracoviště 1 a pracoviště 2 byly rozděleny do čtyř sad sklíček a poskytnuty, po jedné sadě, třem různým kvalifikovaným hodnotitelům (patologům), jednomu hodnotiteli na pracovišti 1, jednomu na pracovišti 2 a jednomu na pracovišti 3. Patologové, kteří neznali stav případů ani barvicí platformu, vyhodnotili všechny čtyři sady sklíček a poskytli klinické skóre (tj. 0, 1+, 2+, 3+) pro každý případ. Výsledky byly analyzovány společností Ventana. Míry PPA (a spodní hranice dvoustranných 95% intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě pozitivního versus negativního klinického hodnocení byly 91,6 % (85,9), 91,2 % (85,3), respektive 94,9 % (89,3) pro hodnotitele A, B a C. Míry NPA (a spodní hranice dvoustranných 95% intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě pozitivního versus negativního klinického hodnocení byly 91,9 % (85,8), 93,8 % (88,3), respektive 99,3 %

(96.3) pro hodnotitele A, B a C. Hodnota OPA pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s použitím přístroje BenchMark ULTRA versus přístroje BenchMark XT na základě analýzy 2×2 pozitivního versus negativního klinického hodnocení byla 91.8 %, 92.5 % a 97.4 % pro hodnotitele A, B, respektive C. Prezentace 3×3 mír shod mezi platformami pro jednotlivé hodnotitele na základě klinického skóre (0/1 +, 2+, 3+) je uvedena v Tab. 11, Tab. 12 a Tab. 13.

Tab. 11. Míry shody mezi platformami 3×3, přístroj BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – hodnotitel A.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Hodnotitel A	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Celkem	96	47	124	267
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			226/267 (84.6) (79.8 – 88.5)	

Tab. 12. Míry shody mezi platformami 3×3, přístroj BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – hodnotitel B.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Hodnotitel B	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Celkem	69	68	130	267
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			242/267 (90.6) (86.5 – 93.6)	

Tab. 13. Míry shody mezi platformami 3×3, přístroj BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – hodnotitel C.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Hodnotitel C	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Celkem	66	52	149	267
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			257/267 (96.3) (93.2 – 98.0)	

Reprodukovatelnost mezi patologi pro vzorky ze studie srovnávací platform

Positivní a negativní míra shody s oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny pro šest možných párových srovnání mezi hodnotiteli pro každou platformu. U přístroje BenchMark ULTRA byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) a 83.5 % (111/133) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) a 98.5 % (132/134) (v daném pořadí). Míra OPA byla nejvyšší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem

B (91.8 %) a nižší mezi hodnotitelem B a hodnotitelem C (91.0 %) a hodnotitelem A a hodnotitelem C (88.8 %).

U přístroje BenchMark XT byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) a 84.7 % (116/137) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) a 98.5 % (128/130) (v daném pořadí). Míra OPA byla nejvyšší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem B (92.5 %) a nižší mezi hodnotitelem B a hodnotitelem C (91.4 %) a hodnotitelem A a hodnotitelem C (89.1 %).

Srovnávací studie mezi detekčními soupravami *VIEW DAB Detection Kit* a *ultraView Universal DAB Detection Kit*

Ve srovnávací studii mezi detekčními soupravami *VIEW DAB Detection Kit* a *ultraView Universal DAB Detection Kit* byla použita 1 kohorta ze 140 případů invazivního karcinomu prsu FFPE [přibližně 35 případů z každé kategorie HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] při barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA. Studie srovnávání detekcí se zúčastnila jediná laboratoř provádějící barvení a tři pracoviště provádějící odečítání ve Spojených státech amerických. U barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA byly míry PPA mezi výsledky získanými metodami *VIEW DAB Detection Kit* a *ultraView Universal DAB Detection Kit*, na základě klinického hodnocení (pozitivní, negativní), 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) a 96.5 % (55/57) pro hodnotitele A, B a C a míry NPA mezi metodami detekce byla 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) a 97.5 % (77/79) pro hodnotitele A, B a C. Míry OPA mezi detekčními soupravami byly 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) a 97.1 % (132/136) pro hodnotitele A, B a C. Prezentace 3×3 mír shod detekce pro jednotlivé hodnotitele na základě klinického skóre (0/1 +, 2+, 3+) je uvedena v Tab. 14, Tab. 15 a Tab. 16.

Tab. 14. Hodnotitel A, *VIEW DAB Detection Kit* vs. *ultraView Universal DAB Detection Kit* – analýza 3×3 míry shody – barvení s protilátkou PATHWAY HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Hodnotitel A	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Celkem	46	25	65	136
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			119/136 (87.5) (80.9 – 92.0)	

Tab. 15. Hodnotitel B, *VIEW DAB Detection Kit* vs. *ultraView Universal DAB Detection Kit* – analýza 3×3 míry shody – barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Hodnotitel B	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Celkem	33	32	71	136
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			128/136 (94.1) (88.8 – 97.0)	

Tab. 16. Hodnotitel C, IVIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – analýza 3×3 míry shody – barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na přístroji BenchMark ULTRA.

IVIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Hodnotitel C	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Celkem	32	25	79	136
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95% CI)			132/136 (97.1) (92.7 – 98.9)	

Reprodukovatelnost mezi pathology pro vzorky ze studie srovnávací metod detekce

Positivní a negativní míra shody s oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny pro šest možných párových srovnání mezi hodnotiteli pro každou metodu. U detekční soupravy IVIEW DAB Detection Kit byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) a 79.7 % (55/69) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) a 97.0 % (65/67) (v daném pořadí). Celková míra shody byla nejvyšší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem B (96.3 %) a nižší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem C (86.0 %) a hodnotitelem B a hodnotitelem C (88.2 %).

U detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) a 86.2 % (56/65) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) a 98.6 % (70/71) (v daném pořadí). Celková míra shody byla pro každou dvojici hodnotitelů podobná, 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) a 92.6 % (126/136) pro hodnotitele A vs. B, hodnotitele A vs. C a hodnotitele B vs. C.

KLINICKÁ VÝKONNOST

Srovnávací studie protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody

Byla provedena studie srovnání metod, která zkoumala korelaci výsledků mezi protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) a PathVysion HER2 FISH, což jsou dříve schválené diagnostické testy FDA. Studie se zúčastnilo šest zkoušejících. Dvě sady tří různých zkoušejících hodnotily dvě nezávislé kohorty (kohorta 1: n = 144, kohorta 2: n = 178) pomocí známých případů rakoviny prsu obarvených s HER2 CB11 a HER2 4B5. Údaje FISH byly získány z anamnézy pacientů. Pro každý případ bylo vytvořeno konsenzuální skóre od tří hodnotitelů pro každou protilátku, aby se snížila variabilita v rámci hodnotitele, o které je známo, že při hodnocení HER2 existuje.^{27,28,29} Celkem bylo vyhodnoceno 322 případů. Sklička obarvená s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) byla zpracována a obarvena podle pokynů výrobce uvedených v metodickém listu protilátky CB11. Mezi obarvením a odečtením skliček obarvených s CB11 byl průměrně přibližně jeden rok. Vzhledem k tomu, že skóre od jednoho ze šesti hodnotitelů bylo mimo interval spolehlivosti, jsou data z těchto dvou kohort prezentována následovně.

Reprodukovatelnost mezi pathology pro vzorky ze srovnávacích studií

Tab. 17. Kohorta 1 – konsenzuální skóre IHC od tří patologů.

Skóre 4B5	Skóre CB11			Celkem
	3+	2+	0, 1+	
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Celkem	31	37	75	143

Kohorta 1: Funkční charakteristiky pro prezentaci 3×3.
Celková shoda je (29 + 13 + 53) / 143 = 66.4 % (95% CI = 38.6 %, 59.7 %).

Kohorta 1: Funkční charakteristiky pro prezentaci 2×2 (jsou spojena skóre pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+) na protilátku HER2).

- Pozitivní procentuální shoda je (29 + 2 + 24 + 13) / (31 + 37) = 100 % (95% CI % = 97.5 % – 100 %).
- Negativní procentuální shoda je 53 / 75 = 70.7 % (95% CI = 58.5 % – 80.1 %).
- Celková shoda je (29 + 24 + 2 + 13 + 53) / 143 = 84.7 % (95% CI = 78.2 % – 90.0 %).

Tab. 18. Kohorta 2 – konsenzuální skóre IHC od tří patologů.

Skóre 4B5	Skóre CB11			Celkem
	3+	2+	0, 1+	
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Celkem	73	20	85	178

Kohorta 2: Funkční charakteristiky pro prezentaci 3×3.
Celková shoda je (72 + 12 + 80) / 178 = 92.1 % (95% CI = 80.1 %, 93.1 %).

Kohorta 2: Funkční charakteristiky pro prezentaci 2×2 (jsou spojena skóre pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+) na protilátku HER2).

- Pozitivní procentuální shoda je (72 + 12 + 1 + 1) / (73 + 20) = 92.5 % (95% CI = 85.2 % – 96.9 %).
- Negativní procentuální shoda je 80 / 85 = 94.1 % (95% CI = 86.8 % – 98.1 %).
- Celková shoda je (72 + 12 + 1 + 1 + 80) / 178 = 93.3 % (95% CI = 88.5 % – 96.4 %).

Tab. 19. Kohorta 1 – konsenzuální skóre IHC CB11 od tří patologů ve srovnání s FISH.

Skóre CB11	Výsledek FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Celkem	86	58	144

Kohorta 1: Funkční charakteristiky pro CB11 a FISH, prezentace 2×2 (kde skóre 2 a 3 jsou považována za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je (32 + 32) / 86 = 74.4 % (95% CI = 63.8 % – 83.2 %).
- Negativní procentuální shoda je 53 / 58 = 91.4 % (95% CI = 80.9 % – 97.1 %).
- Celková shoda je (32 + 32 + 53) / 144 = 81.2 % (95% CI = 73.9 % – 87.2 %).

Tab. 20. Kohorta 1 – konsenzuální skóre IHC 4B5 od tří patologů ve srovnání s FISH.

Skóre 4B5	Výsledek FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Celkem	86	58	144

Kohorta 1: Funkční charakteristiky pro 4B5 a FISH, prezentace 2×2 (kde skóre 2 a 3 jsou považována za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $(55 + 25) / 86 = 93.0\%$ (95% CI = 87.9 % – 96.3 %).
- Negativní procentuální shoda je $47 / 58 = 81.0\%$ (95% CI = 73.4 % – 86.0 %).
- Celková shoda je $(55 + 25 + 47) / 144 = 88.2\%$ (95% CI = 82.1 % – 92.2 %).

Tab. 21. Kohorta 2 – konsenzuální skóre IHC CB11 od tří patologů ve srovnání s FISH.

Skóre CB11	Výsledek FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Celkem	93	85	178

Kohorta 2: Funkční charakteristiky pro CB11 a FISH, prezentace 2×2 (kde skóre 2 a 3 jsou považována za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $(72 + 13) / 93 = 91.3\%$ (95% CI = 85.0 % – 96.7 %).
- Negativní procentuální shoda je $77 / 85 = 90.6\%$ (95% CI = 83.9 % – 96.3 %).
- Celková shoda je $(72 + 13 + 77) / 178 = 91.0\%$ (95% CI = 86.5 % – 94.9 %).

Tab. 22. Kohorta 2 – konsenzuální skóre 4B5 IHC od tří patologů: ve srovnání s FISH.

Skóre 4B5	Výsledek FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Celkem	93	85	178

Kohorta 2: Funkční charakteristiky pro 4B5 a FISH, prezentace 2×2 (kde skóre 2 a 3 jsou považována za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $(72 + 11) / 93 = 89.2\%$ (95% CI = 82.5 % – 95.1 %).
- Negativní procentuální shoda je $77 / 85 = 90.6\%$ (95% CI = 84.0 % – 96.4 %).
- Celková shoda je $(72 + 11 + 77) / 178 = 90.0\%$ (95% CI = 85.4 % – 93.6 %).

Tab. 23. Kohorta 1: Vyhodnocení 4B5 u tří patologů.

Skóre HER2	Skóre 4B5		
	Zkoušející 1	Zkoušející 2	Zkoušející 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Celkem	174	178	178

Poznámka: Celkem 3 vzorky se při hodnocení třemi patologi lišily o více než jeden stupeň (tj. 0, 2+).

Vzorek 1: Jeden patolog vyhodnotil 2+, dva patologové 0+.

Vzorek 2: Jeden patolog vyhodnotil 0+ dva patologové 2+.

Vzorek 3: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 1+ a třetí vyhodnotil 2+.

Tab. 24. Kohorta 1: Vyhodnocení CB11 u tří patologů.

Skóre HER2	Skóre CB11		
	Zkoušející 1	Zkoušející 2	Zkoušející 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Celkem	174	178	178

Poznámka: Celkem 1 vzorek se při hodnocení třemi patologi lišil o více než jeden stupeň (tj. 1–3+).

Vzorek 1: Jeden patolog vyhodnotil 1+, druhý vyhodnotil 2+ a třetí vyhodnotil 3+.

Tab. 25. Kohorta 2: Vyhodnocení 4B5 u tří patologů.

Skóre HER2	Skóre 4B5		
	Zkoušející 4	Zkoušející 5	Zkoušející 6
3+	59	65	50
2+	30	28	39
0,1+	52	51	55
Celkem	141	144	144

Poznámka: Celkem 6 vzorků se při hodnocení třemi patologi lišilo o více než jeden stupeň (např. 0, 3+).

Vzorek 1: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 0+ a třetí vyhodnotil 2+.

Vzorek 2: Jeden patolog vyhodnotil 1+, druhý vyhodnotil 1+ a třetí vyhodnotil 3+.

Vzorek 3: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 2+ a třetí patolog vyhodnotil 2+.

Vzorek 4 a 5: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 2+ a třetí vyhodnotil 2+.

Vzorek 6: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 3+ a třetí vyhodnotil 3+.

Reprodukovatelnost mezi patologi pro vzorky ze srovnávacích studií

Vzhledem ke známému faktu, že různí patologové mohou IHC sklíčka interpretovat různě, tři patologové analyzovali každou ze dvou kohort (celkem 6 patologů), aby odečetli a vyhodnotili všechny vzorky. K posouzení konečných výsledků bylo použito pravidlo „dva ze tří“. Níže je uveden souhrn variabilních výsledků získaných třemi patologi vzorků u srovnávací studie pro každou kohortu (kohorta 1: n = 178, kohorta 2: n = 144).

Tab. 26. Kohorta 2: Vyhodnocení CB11 u tří patologů.

Skóre HER2	Skóre CB11		
	Zkoušející 4	Zkoušející 5	Zkoušející 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Celkem	144	144	144

Poznámka: Celkem 8 vzorků se při hodnocení třemi patologiemi lišilo o více než jeden stupeň (tj. 0–2+).
Vzorky 1–6: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 1+ a třetí vyhodnotil 2+.
Vzorky 7 a 8: Jeden patolog vyhodnotil 0+, druhý vyhodnotil 2+ a třetí vyhodnotil 2+.

Niže je uvedena tabulka rozsahů procentuálních shod mezi dvojicemi patologů (tři dvojice pro každou kohortu).

Tab. 27. Rozsahy shod 2X2 * pro tři patologi.

	Celková procentuální shoda	Positivní procentuální shoda	Negativní procentuální shoda
4B5 vs. CB11			
Kohorta 1	82.6 – 86.9 %	97.3 – 100.0 %	68.0 – 75.4 %
Kohorta 2	88.2 – 95.5 %	87.6 – 95.6 %	86.1 – 95.4 %
4B5 vs. FISH			
Kohorta 1	86.8 – 88.2 %	90.7 – 94.2 %	79.3 – 81.0 %
Kohorta 2	87.4 – 89.9 %	88.2 – 90.0 %	84.5 – 91.8 %
CB11 vs. FISH			
Kohorta 1	79.9 – 84.0 %	73.3 – 80.2 %	89.7 – 89.7 %
Kohorta 2	84.8 – 93.3 %	86.7 – 92.5 %	82.7 – 94.1 %

*0, 1+ = negativní. 2+ a 3+ = pozitivní

Studie klinického výsledku – KATHERINE

Výkonnosti protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a testu INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (test ISH INFORM HER2 Dual) byly zkoumány ve studii KATHERINE (BO27938), randomizované, multicentrické, otevřené studii fáze III, za účelem vyhodnocení účinnosti a bezpečnosti trastuzumab emtansinu (KADCYLA) oproti trastuzumabu coby adjuvantní léčby u pacientů s primární rakovinou prsu pozitivní na HER2, kteří mají po předoperační léčbě reziduální tumor patologicky přítomný v prsu nebo axilárních lymfatických uzlinách (NCT01772472).

Pacientské vzorky byly obarveny s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a/nebo s testem ISH INFORM HER2 Dual a byly hodnoceny z hlediska přijatelnosti barvení a stavu HER2. Celkově bylo nejvíce vzorků z biopsií před léčbou (80.9 %), odebraných primárně jako biopsie (75.3 %) nebo chirurgickými metodami (24.3 %). Více vzorků vykazovalo podtyp duktální neoplastické změny (95.4 %) a většina nebyla získána ze vzorku metastázy (96.2 %).

Tab. 28 popisuje celkovou míru přijatelnosti barvení pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) určenou k diagnostice populace (ITD) na úrovni subjektu. Z celkového počtu 1788 subjektů v populaci PATHWAY ITD se 55 pokusů o počáteční barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) nezdařilo. Při opakování barvení u těchto subjektů bylo úspěšného barvení dosaženo až na čtyři u všech. Počáteční a konečná celková míra přijatelnosti barvení pro protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) byla 96.9 %, respektive 99.8 %. Rovněž jsou uváděny míry přijatelnosti barvení pozadí a přijatelnosti morfologie pro sklíčka obarvená s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Počáteční a konečná míra přijatelnosti barvení pozadí pro populaci ITD byla 99.6 %, respektive 99.9 %. Počáteční a konečná míra přijatelnosti morfologie byla 99.2 %, respektive 99.9 %.

Tab. 28. Funkční charakteristiky barvení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Atribut	Míra přijatelnosti % (n/N) (95% CI)	
	Počáteční *	Konečná **
Celková míra přijatelnosti barvení	96.9 (1733/1788) (96.0, 97.6)	99.8 (1784/1788) (99.4, 99.9)
Pozadí	99.6 (1768/1775) (99.2, 99.8)	99.9 (1786/1787) (99.7, 100.0)
Morfologie	99.2 (1762/1776) (98.7, 99.5)	99.9 (1787/1788) (99.7, 100.0)

*Počáteční pokus o barvení je prvním pokusem o barvení pro subjekt

**Konečný pokus o barvení je pokus o barvení, který byl použit k rozhodnutí o zařazení do studie BO27938

Ve studii KATHERINE bylo zařazeno 1486 pacientů s rakovinou prsu v časném stádiu, pozitivní na HER2, s reziduálním invazivním nádorem v prsu a/nebo axilárních lymfatických uzlinách po léčbě založené na taxanu a trastuzumabu jako součást neoadjuvantní léčby před zařazením do studie. Pacienti obdrželi radioterapii a/nebo hormonální terapii souběžně se zkoumanou léčbou podle místních pokynů. Pro prokázání nadměrné exprese HER2 definované jako amplifikační poměr 3+ IHC nebo ISH ≥ 2.0 , stanovené v centrální laboratoři, byly vyžadovány vzorky nádoru prsu. Pacienti byli pro podávání trastuzumabu nebo přípravku KADCYLA randomizováni (1 : 1). Randomizace byla stratifikována podle klinického stadia při prezentaci, stavu hormonálních receptorů, předoperační léčby zaměřené na HER2 (trastuzumab, trastuzumab plus další látky směřované na HER2) a patologického stavu uzliny hodnocené po předoperační léčbě.

Přípravek KADCYLA byl podán intravenózně v dávce 3.6 mg/kg 1. den 21denního cyklu. Trastuzumab byl podán intravenózně v dávce 6 mg/kg 1. den 21denního cyklu. Pacienti byli léčeni přípravkem KADCYLA nebo trastuzumabem po celkem 14 cyklů, pokud nedošlo k recidivě nemoci, odvolání souhlasu anebo nepřijatelné toxicitě, podle toho, co nastalo dříve. V době primární analýzy byla střední doba trvání léčby 10 měsíců (rozmezí: 1–12) pro přípravek KADCYLA a střední doba trvání léčby 10 měsíců (rozmezí: 1–13) pro trastuzumab. Pacienti, kteří přerušili léčbu přípravkem KADCYLA, mohli v příslušných případech na základě zvážení toxicity a úsudku zkoušejícího dokončit dobu léčby plánovanou v rámci studie až po 14 cyklů léčby s trastuzumabem zaměřeným na HER2.

Primárními cílovými parametry účinnosti ve studii KATHERINE bylo přežití bez invazivního onemocnění (IDFS). IDFS bylo definováno jako čas od data randomizace do prvního výskytu recidivy ipsilaterálního invazivního nádoru prsu, ipsilaterální lokální nebo regionální invazivní rakoviny prsu, vzdálené recidivy, kontralaterální invazivní rakoviny prsu nebo úmrtí z jakékoli příčiny.

Demografické charakteristiky a charakteristiky tumoru u pacientů byly v rámci léčby dobře vyvážené. Střední věk byl přibližně 49 let (rozmezí 23–80 let), 72.8 % bělochů, 8.7 % Asijců a 2.7 % černochů nebo Afroameričanů. Kromě 5 pacientů se jednalo o ženy. 22.5 % pacientů bylo zařazeno v Severní Americe, 54.2 % v Evropě a 23.3 % ve zbytku světa. Prognostické charakteristiky nádoru včetně stavu hormonálních receptorů (pozitivní: 72.3 %, negativní: 27.7 %), klinická fáze při prezentaci (inoperabilní: 25.3 %, operabilní: 74.8 %) a patologický stav uzliny po předoperační léčbě (pozitivní uzlina: 46.4 %, negativní uzlina nevyhodnocena: 53.6 %) byly v rámci studie podobné.

Většina pacientů (76.9 %) obdržela neoadjuvantní chemoterapeutický režim obsahující antracyklin. 19.5 % pacientů obdrželo kromě trastuzumabu další látku cílenou na HER2 jako součást neoadjuvantní léčby. Pertuzumab byl druhou léčbou u 93.8 % pacientů, kteří dostávali druhou neoadjuvantní látku zaměřenou na HER2.

Klinicky významné a statisticky významné zlepšení u IDFS bylo pozorováno u pacientů, jejichž vzorky z rakoviny prsu byly identifikovány jako pozitivní na HER2 s testem PATHWAY anti-HER2 (4B5), kteří dostávali trastuzumab emtansin (KADCYLA), ve srovnání s trastuzumabem (Herceptin) (HR = 0.43, 95% CI [0.32, 0.58]), což odpovídá 57% snížení rizika události IDFS. Výsledky účinnosti pro IHC pozitivní podskupinu jsou uvedeny v Tab. 29 a na Obr. 2.

Analýza dat také ukazuje, že s úpravou nebo bez úpravy pro diferenciální vzorkování ve zkoumané populaci v důsledku předběžného screeningu místními testy jsou odhady účinnosti léku podobné.

Tab. 29. Výsledky účinnosti ze studie KATHERINE pro pozitivní podskupinu IHC.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
<i>Primární cílový parametr</i>	Přežití bez invazivních nemocí (IDFS)¹	
Počet (%) pacientů s událostí	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [95% CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
3letá míra bez události ² %	89.0	75.7

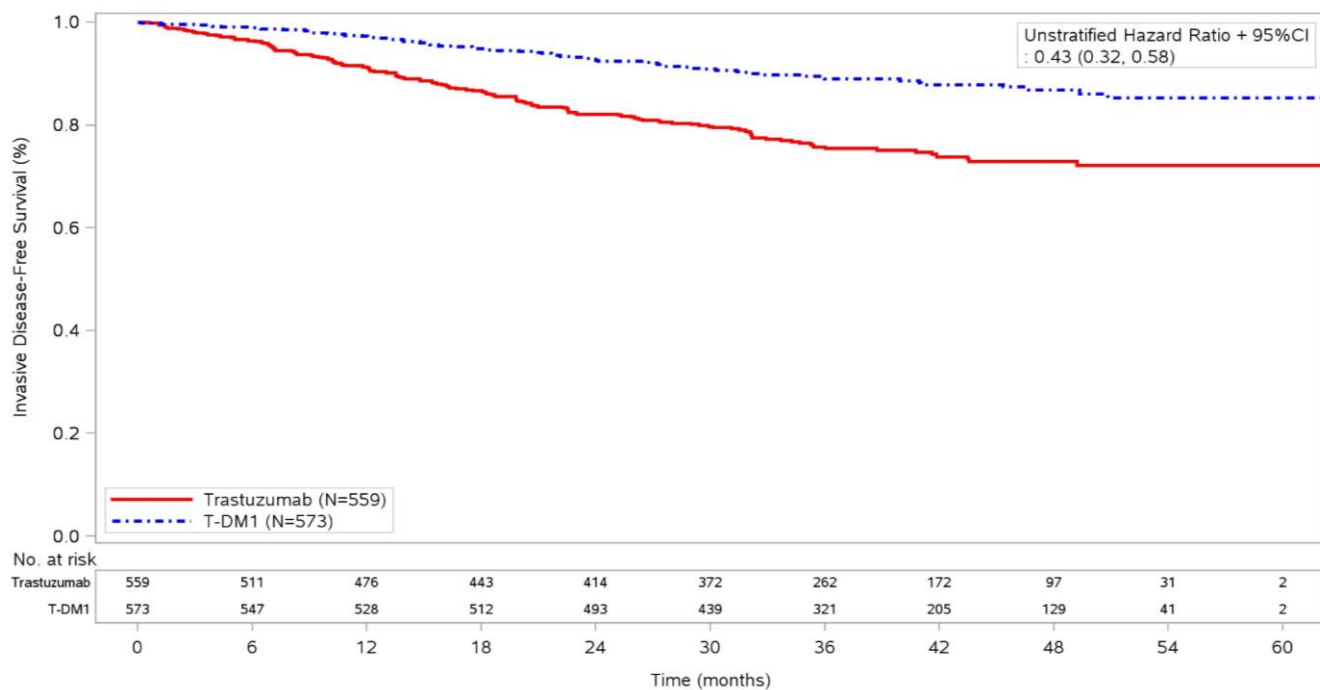
1. Data z první průběžné analýzy

2. Třiletá míra bez události odvozená z Kaplanových-Meierových odhadů

Údaje ze studie KATHERINE ukazují, že adjuvantní trastuzumab emtansine (KADCYLA) prokázal jasný přínos léčby ve srovnání s adjuvantním trastuzumabem (Herceptin) u pacientů s rakovinou prsu v časném stádiu s pozitivitou na HER2, se zbytkovým onemocněním po dokončení neoadjuvantní léčby. Testy PATHWAY anti-HER2 (4B5) a INFORM HER2 Dual ISH jsou užitečné při identifikaci těch pacientů, u nichž je pravděpodobné, že budou mít z léčby trastuzumab emtansinem (KADCYLA) prospěch.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

1. Pokud pozitivní kontrola vykazuje slabší zabarvení, než se očekávalo, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagensů.
2. Pokud je kontrola negativní, je třeba ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má sklíčko správný štítek s čárovým kódem. Pokud je sklíčko správně označeno, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagensů. Tkáně mohly být nesprávně odebrány, fixovány nebo odparafinovány. Při odběru, skladování a fixaci je třeba dodržovat správný postup.
3. Pokud nebyl odstraněn veškerý parafin, může se stát, že nedojde k barvení. Postup odparafinování je třeba opakovat.
4. Pokud je barvení specifické protilátky příliš intenzivní, cyklus je třeba opakovat s dobou inkubace zkrácovanou po 4minutových intervalech do dosažení požadované intenzity barvení.
5. Pokud se tkáňové řezy ze sklíčka vymývají, je třeba sklíčka zkontrolovat a zajistit, aby byla pozitivně nabitá.
6. Nápravné opatření najdete v uživatelské příručce přístroje v části Jednotlivé kroky postupu, případně se obraťte na místní servisní zastoupení.



Obr. 2. Kaplanova-Meierova křivka přežití bez invazivních onemocnění ve studii KATHERINE. (T-DM1: trastuzumab emtansin (KADCYLA))

LITERATURA

1. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232:1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumour cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J*. 1987;6:605-610.
3. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
4. Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egfr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
5. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
6. Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
7. Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
8. Keatings L, Sinclair J, Wright C, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17:234-247.
9. Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
10. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69:57-58.
11. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses Her2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.
12. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
13. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
14. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-628.
15. DePotter CR, Van Daele S, Van De Vijver MJ, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.
16. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
17. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1980.
18. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register*.
19. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
20. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
21. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
22. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
23. CLSI. *Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline*. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
24. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66:194-199.
25. 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. *Am J Clin Pathol*. 1980;73:626-32.
26. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
27. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2001;14:1079-86.
28. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*. 1994;47:816-22.
29. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-182.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vždy tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají.

Souhrn bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboly

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: definici použitých symbolů naleznete na internetových stránkách dialog.roche.com):



Číslo položky Global Trade

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

Přidání, odstranění nebo změny jsou označeny pruhem změn na okraji.

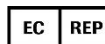
© 2020 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ INFORMACE



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

