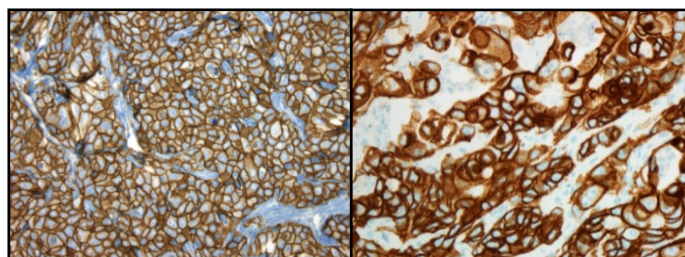


VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

REF 790-7167

09670564001

IVD  50



Rys 1. Tkanka raka sutka
wybarwiona przy użyciu przeciwciała
VENTANA HER2 (4B5) Rabbit
Monoclonal Primary Antibody RxDx.

Rys 2. Tkanka raka żołądka
wybarwiona przy użyciu przeciwciała
VENTANA HER2 (4B5) Rabbit
Monoclonal Primary Antibody RxDx,
o intensywności barwienia
odpowiadającej ocenie 3+.

PRZEZNACZENIE

Przeciwciało VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx jest przeznaczone do ilościowej, immunohistochemicznej (IHC) detekcji antygenu HER2 w skrawkach tkanek sutka i żołądka utwardzonych w formalinie i zatopionych w parafinie, wybarwionych w aparacie BenchMark IHC/ISH.

Ten wyrób do detekcji IHC jest przeznaczony do stosowania jako towarzyszący test diagnostyczny do identyfikacji pacjentów z rakiem sutka kwalifikujących się do zastosowania terapii z użyciem trastuzumabu (ocena IHC 3+ lub ocena IHC 2+/amplifikacja metodą ISH), pertuzumabu (ocena IHC 3+ lub ocena IHC 2+/amplifikacja metodą ISH), trastuzumabu emtanzyny (ocena IHC 3+ lub ocena IHC 2+/amplifikacja metodą ISH) lub trastuzumabu derukstekanu (ocena IHC 1+ lub ocena IHC 2+/brak amplifikacji metodą ISH). Ponadto ten wyrób do detekcji IHC jest przeznaczony do stosowania jako towarzyszący test diagnostyczny do identyfikacji pacjentów z rakiem żołądka kwalifikujących się do zastosowania terapii z użyciem trastuzumabu (ocena IHC 3+ lub ocena IHC 2+/amplifikacja metodą ISH).

Wyniki uzyskane przy użyciu tego produktu powinny zostać zinterpretowane przez wykwalifikowanego patomorfologa na podstawie badań histopatologicznych, odpowiednich danych klinicznych i właściwych kontroli.

To przeciwciało jest przeznaczone do stosowania w diagnostyce in vitro (IVD).

STRESZCZENIE I INFORMACJE OGÓLNE

Przeciwciało VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (test VENTANA HER2 (4B5)) to królicze przeciwciało monoklonalne (klon 4B5) skierowane przeciwko wewnętrznej domenie ludzkiego receptora nabłonkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2). Antygen HER2 sklonowano i opisano.¹ Wykazano, że klon 4B5 reaguje w metodzie Western blot z białkiem o masie cząsteczkowej 185 kDa obecnym w lisatach komórek SK-BR-3. SK-BR-3 to linia komórkowa raka sutka ze 128-krotną nadekspresją mRNA białka HER2.² Rozmiar zidentyfikowanego prążka jest dobrze skorelowany z prążkiem odpowiadającym białku HER2 (185 kDa).¹ Badania immunohistochemiczne (IHC) na transfekowanych liniach komórkowych (HEK293) wykazały, że klon 4B5 barwi komórki transfekowane materiałem genetycznym kodującym białko HER2 oraz komórki transfekowane materiałem genetycznym kodującym białko HER4, natomiast nie barwi komórki transfekowane materiałem genetycznym kodującym białko HER1 lub białko HER3. Dane uzyskane metodą Western blot przy użyciu rekombinowanego białka HER4 wskazują również, że klon 4B5 rozpoznaje epitop białka HER4.³ Mimo to nie zaobserwowano, aby podczas immunohistochemicznego (IHC) barwienia tkanek sutka utwardzonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) doszło do reaktywności krzyżowej pomiędzy białkiem HER2 (4B5) a białkiem HER4.⁴

Białko HER2 to receptor śródbłonkowy o aktywności kinazy tyrozynowej, którego budowa strukturalna jest podobna do receptora nabłonkowego czynnika wzrostu.^{5,6} Amplifikację genu i odpowiadającą jej nadekspresję białka HER2 zaobserwowano w różnych typach guzów, w tym rakach sutka.^{5,6,7} Nadekspresja białka spowodowana amplifikacją genu HER2 jest głównym czynnikiem napędzającym onkogenezę związaną z białkiem HER2.⁵ Amplifikacja genu zazwyczaj skutkuje znaczącym wzrostem ilości receptorów HER2 w błonie komórkowej.^{5,6} Nadekspresja białka HER2 nasila transdukcję sygnału, co prowadzi do wzrostu intensywności proliferacji i różnicowania komórek, a ostatecznie powoduje powstawanie guza.^{5,6}

Zaobserwowano spektrum ekspresji białka HER2 przy braku amplifikacji genu.⁸ W celu wyjaśnienia przyczyny występowania pośrednich poziomów ekspresji białka HER2 w przypadkach raka sutka przy braku amplifikacji genu zaproponowano kilka czynników, w tym transaktywację (ang. crosstalk) pomiędzy szlakami sygnałowymi receptora HER2 i receptora estrogenowego.^{8,9} Ekspresja białka HER2, która nie jest uznawana za nadekspresję, jest klasyfikowana jako niska ekspresja HER2.^{8,10,11}

Nadekspresja białka HER2 i/lub amplifikacja genu zachodzą w gruczolakorakach żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego.^{12,13,14} W publikacjach dotyczących badań nad rakami tego typu wskazywano na szeroki zakres częstości występowania nadekspresji HER2. Z jednego z największych zestawów danych przesiewowych, obejmującego 3803 pacjentów z gruczolakorakiem żołądka i połączenia przełykowo-żołądkowego, wynika jednak, że 22 procent pacjentów otrzymało dodatni wynik testu pod kątem nadekspresji białka HER2 lub amplifikacji genu.¹⁵

ZNACZENIE KLINICZNE

Rak sutka jest najczęściej rozpoznawanym typem raka wśród kobiet na całym świecie.¹⁶ Wczesna detekcja i wdrożenie odpowiedniego leczenia mogą znacząco wpłynąć na przeżycie całkowite.^{7,17} Około 15–30 procent przypadków inwazyjnego przewodowego raka sutka jest HER2-dodatnich.^{7,10} Status dodatni obserwuje się w niemalże każdym przypadku choroby Pageta brodawki sutkowej i do 90 procent przypadków czopiastego raka przewodowego in situ.^{18,19} Status HER2-dodatni od ponad 20 lat jest wykorzystywany do definiowania podgrupy pacjentów z rakiem sutka, którzy odnoszą korzyści z terapii celowanej przeciwko receptorowi HER2.^{7,17} Populacja HER2-dodatnia była historycznie definiowana jako pacjenci z nadekspresją białka HER2, ocenianą metodą immunohistochemiczną (IHC) w oparciu o system ilościowych wyników IHC (0, 1+, 2+ i 3+), i/lub amplifikacją genu kodującego to białko, ocenianą metodą hybrydyzacji in situ (ISH).¹⁷ Wykazano silną korelację statusu HER2-dodatniego z nadekspresją białka kodowanego przez ten gen (ocena IHC 3+). W przypadku nadekspresji granicznej (ocena IHC 2+ lub ocena niejednoznaczna) w celu oceny amplifikacji genu zgodnie z ustalonym algorytmem oceny białka HER2 może być wymagane wykonanie dodatkowego testu potwierdzającego.¹⁷

Wykazano, że stosowanie dostępnych na rynku leków terapeutycznych, takich jak Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) czy KADCYLA (ado-trastuzumab emtanzyna/trastuzumab emtanzyna), ma korzystny wpływ na pacjentów z HER2-dodatnim rakiem sutka, ponieważ prowadzi do zatrzymania wzrostu guza, a w niektórych przypadkach zmniejszenia masy guza.^{20–24} Trastuzumab i pertuzumab to humanizowane przeciwciała monoklonalne, które przyłączają się do białka HER2 na powierzchni komórki i zakłócają transdukcję sygnału, w której pośredniczy białko HER2.^{20,24,25} Trastuzumab emtanzyna to koniugat przeciwciała i leku składający się z trastuzumabu i środka cytotoksycznego DM1 skoniugowanych poprzez nierozszczepialny łącznik.²³ Leczenie przy użyciu trastuzumabu (Herceptin), pertuzumabu (PERJETA) lub trastuzumabu emtanzyny (KADCYLA) może być skuteczne jedynie w przypadku pacjentów z HER2-dodatnim rakiem sutka (ocena IHC 3+ lub 2+ z potwierdzoną amplifikacją genu HER2).^{16,18}

U około 40–50 procent pacjentów z rakiem sutka występują guzy, które nie wykazują amplifikacji genu HER2 oraz nadekspresji receptora, lecz mimo to wykrywana jest u nich niska ekspresja białka HER2.^{8,10} Przypadki wykazujące niską ekspresję białka HER2 (ocena IHC 1+ lub 2+ (z potwierdzonym brakiem amplifikacji genu HER2)) zazwyczaj są uznawane za HER2-ujemne i klasyfikowane jako nienadające się do leczenia celowanego przeciwko receptorowi HER2.⁸ Niedawno zaobserwowano korzystny wpływ stosowania leczenia trastuzumabem derukstekanem (ENHERTU®) skierowanego przeciwko receptorowi HER2 u pacjentów z rakiem sutka o niskim poziomie ekspresji białka HER2.^{26,27} Trastuzumab derukstekan to koniugat przeciwciała i leku zawierający przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko białku HER2 (trastuzumab) z dodatkiem

rozszerzalnego łącznika i pochodnej eksatekanu przenikającej przez błonę komórkową (ładunek w postaci inhibitora topoizomazy I).¹⁰

Diagnostyka in vitro w celu oceny statusu HER2 w tkankach raków sutka wspomaga lekarzy podejmujących decyzję o zastosowaniu terapii z użyciem trastuzumabu (Herceptin), pertuzumabu (PERJETA), trastuzumabu emtanzyny (KADCYLA) lub trastuzumabu derukstekanu (ENHERTU®).¹⁷ Detekcja ekspresji białka HER2 wykonywana metodą IHC jest wykorzystywana pomocniczo podczas oceny pacjentów z rakiem sutka, w przypadku których rozważa się zastosowanie leczenia trastuzumabem (Herceptin), pertuzumabem (PERJETA), trastuzumabem emtanzyną (KADCYLA) lub trastuzumabem derukstekanem (ENHERTU®), ukierunkowanego przeciwko receptorowi HER2.

Rak żołądka jest piątym najczęściej występującym rakiem i główną przyczyną zgonów z powodu raka na świecie.¹³ Najczęstszą metodą leczenia raka żołądka jest interwencja chirurgiczna.^{14,28} Większość przypadków raka żołądka zostaje jednak wykrytych w zaawansowanym stadium, przez co przeprowadzenie operacji jest często bardzo trudne.^{14,28} W leczeniu zaawansowanego raka żołądka stosuje się chemioterapię, mimo że przeżywalność pacjentów chorujących na raka tego typu jest bardzo niska.^{14,28} Leczenie trastuzumabem w ramach terapii celowanej przeciwko receptorowi HER2 stanowi podstawę w leczeniu inwazyjnego raka sutka i ma wartość terapeutyczną w leczeniu pacjentów z rakiem żołądka z nadekspresją tego receptora.^{12,14} Stwierdzenie amplifikacji genu *HER2* i/lub nadekspresji białka jest kluczowe podczas kwalifikacji pacjentów do leczenia trastuzumabem.^{12,14} W badaniach klinicznych wykazano, że stosowanie trastuzumabu szczególnie korzystnie wpływa na pacjentów z rakiem sutka lub rakiem żołądka o wysokim poziomie nadekspresji białka HER2 i/lub amplifikacji genu.^{12,21} Detekcja ekspresji białka HER2 wykonywana metodą IHC jest wykorzystywana pomocniczo podczas oceny pacjentów z rakiem żołądka, w przypadku których rozważa się zastosowanie leczenia trastuzumabem (Herceptin).

ZASADA DZIAŁANIA

Test VENTANA HER2 (4B5) zawiera królicze przeciwciało monoklonalne, które przyłącza się do białka HER2 w skrawkach tkanek FFPE. To swoiste przeciwciało można zlokalizować przy użyciu koniugatu przeciwciała drugorzędowego i HRP (zestawu *ultraView Universal DAB Detection Kit*). Powstały swoisty kompleks przeciwciała-enzym jest wówczas widoczny pod postacią wytrąconego osadu, będącego enzymatycznym produktem reakcji. Każdy krok obejmuje inkubację przez określony czas w określonej temperaturze. Pod koniec każdego kroku inkubacji skrawki są przepłukiwane przez aparat w celu zatrzymania reakcji i usunięcia niezwiązane materiału, który utrudniałby zajście żądanej reakcji w kolejnych krokach. Aparat również nanosi roztwór Liquid Coverslip, który minimalizuje parowanie odczynników wodnych z preparatu z próbki.

Przypadki kliniczne powinny być oceniane w kontekście wyników otrzymanych dla odpowiednich kontroli. Zaleca się włączenie do badania tkanki do kontroli dodatniej utwalonej i poddanej obróbce w taki sam sposób jak próbka pacjenta (np. tkanka raka sutka o słabym barwieniu dodatnim). Poza barwieniem przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) należy przeprowadzić barwienie drugiego preparatu przy użyciu przeciwciała CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby test został uznany za ważny, w dodatniej kontroli tkankowej musi wystąpić barwienie błonowe komórek guza. Komórki te powinny wykazywać barwienie ujemne podczas barwienia przy użyciu przeciwciała CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Dodatkowo jest zalecane, aby ujemny kontrolny preparat tkankowy (np. tkanka raka sutka lub raka żołądka o ujemnym statusie HER2) był uwzględniany dla każdej partii próbek poddawanych obróbce i wybarwianych w aparacie BenchMark IHC/ISH. Aby upewnić się, że nie doszło do fałszywie dodatniego barwienia spowodowanego wzmacnianiem antygenu lub innymi procedurami wstępnej obróbki preparatu, należy wybarwić ujemną tkankę kontrolną przy użyciu przeciwciała VENTANA HER2 (4B5) RxDx.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

Test VENTANA HER2 (4B5) zawiera odczynnik w ilości wystarczającej do przeprowadzenia 50 testów.

Jeden dozownik 5 mL testu VENTANA HER2 (4B5) zawiera około 30 µg króliczego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko ludzkiemu antygenowi HER2.

Przeciwciało jest rozcieńczone w soli fizjologicznej buforowanej 0.05 M Tris z dodatkiem 0.01 M EDTA, środka Brij-35 w stężeniu 0.05%, białka nośnikowego w stężeniu 0.3% i azydku sodu w stężeniu 0.05%, będącego konserwantem. Odczynnik zawiera śladowe ilości płodowej surowicy cielęcej w stężeniu około 0.25%, pochodzącej z roztworu podstawowego.

Stężenie swoistego przeciwciała wynosi około 6 µg/mL.

Test VENTANA HER2 (4B5) zawiera króliczą immunoglobulinę IgG pozyskiwaną poprzez rozcieńczenie supernatantów z hodowli komórkowej.

Szczegółowy opis następujących kwestii znajduje się w arkuszu metody odpowiedniego zestawu detekcyjnego firmy VENTANA: Zasada działania, Materiały i metody, Pobieranie próbek i przygotowanie ich do analizy, Procedury kontroli jakości, Rozwiązywanie problemów, Interpretacja wyników i Ograniczenia metody.

MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

W skład dostarczonego zestawu nie wchodzi odczynniki do barwienia, takie jak zestawy detekcyjne firmy VENTANA, ani elementy pomocnicze, takie jak dodatnie i ujemne kontrole preparaty tkankowe.

Nie wszystkie produkty przedstawione w arkuszu metody są dostępne we wszystkich regionach geograficznych. Odpowiednich informacji udzieli lokalny przedstawiciel działu pomocy technicznej.

Wymienione niżej odczynniki i materiały mogą być potrzebne do przeprowadzenia barwienia, ale nie są dostarczane:

1. Zalecana tkanka kontrolna
2. Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (nr kat. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView* DAB Detection Kit (nr kat. 760-500 / 05269806001)
5. EZ Prep Concentrate (10X) (nr kat. 950-102 / 05279771001)
6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (nr kat. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Predilute) (nr kat. 650-010 / 05264839001)
8. ULTRA LCS (Predilute) (nr kat. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (nr kat. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (nr kat. 950-224 / 05424569001)
11. Hematoxylin II (nr kat. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (nr kat. 760-2037 / 05266769001)
13. Sprzęt laboratoryjny do ogólnego użytku
14. Aparat BenchMark IHC/ISH

PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Produkt, bezpośrednio po odebraniu i zawsze, gdy nie jest używany, należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Nie zamrażać.

W celu zapewnienia właściwego dozowania odczynnika i stabilności przeciwciała po każdym użyciu na dozownik należy założyć zatyczkę i niezwłocznie umieścić go w lodówce w pozycji pionowej.

Na każdym dozowniku przeciwciała podana jest data ważności. Prawdopodobnie przechowywany odczynnik zachowuje stabilność do daty podanej na etykiecie. Nie należy używać odczynnika po upływie daty ważności.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Do stosowania z tym przeciwciałem pierwszorzędowym nadają się rutynowo przygotowane tkanki FFPE pod warunkiem stosowania zestawów detekcyjnych firmy VENTANA i aparatów BenchMark IHC/ISH. Zalecanym środkiem do utwalania tkanek jest obojętna zbuforowana formalina w stężeniu 10%.²⁹ Preparaty należy niezwłocznie wybarwić, ponieważ antygenowość ciętych skrawków tkanek może z czasem ulegać osłabieniu.

W przypadku badania nieznanymi próbkami zalecane jest jednoczesne przeprowadzenie kontroli dodatniej i ujemnej.

Próbki tkanek należy pociąć na skrawki o grubości około 4 µm i umieścić je na szkiełkach podstawowych. Wskazane jest używanie szkiełek Superfrost Plus lub ich odpowiednika. Badania wskazują, że wysuszone na powietrzu skrawki tkanek i skrawki z linii komórkowych przechowywane w temperaturze 2–8°C pozostają stabilne przez co najmniej 45 dni. Każde laboratorium powinno walidować stabilność preparatów ciętych skrawków tkanek zgodnie z wewnętrznymi procedurami i środowiskowymi warunkami przechowywania preparatów.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Do stosowania w diagnostyce in vitro (IVD).
2. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
3. Nie wykonywać większej liczby testów niż liczba określona na etykiecie.
4. Naładowane dodatnio szkiełka podstawowe mogą być podatne na czynniki środowiskowe powodujące niewłaściwe barwienie. Aby uzyskać więcej informacji na

temat postępowania ze szkiełkami tego typu, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

5. Materiały pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego należy traktować jako materiały stanowiące zagrożenie biologiczne i usuwać je z zachowaniem właściwych środków ostrożności. W przypadku narażenia należy przestrzegać wytycznych określonych w dyrektywach wydanych przez właściwe organy.^{30,31}
6. Unikać kontaktu odczynników z oczami i błonami śluzowymi. W przypadku kontaktu odczynników z wrażliwymi miejscami splukiwać obficie dużą ilością wody.
7. Unikać skażenia mikrobiologicznego odczynników ze względu na możliwość otrzymania nieprawidłowych wyników.
8. Produkt ten nie jest klasyfikowany jako substancja niebezpieczna, jeśli jest używany zgodnie z instrukcją. Konserwantem wchodzącym w skład produktu jest azcydek sodu. Objawami nadmiernej ekspozycji na azcydek sodu mogą być podrażnienia skóry i oczu oraz podrażnienia błon śluzowych i górnych dróg oddechowych. Stężenie azcydu sodu w tym produkcie wynosi 0.05%, a więc produkt ten nie jest klasyfikowany jako substancja niebezpieczna. Nagromadzony NaH₃ może reagować z oliwaną i miedzią instalacją wodociągową, tworząc silnie wybuchowe azcydki metali. Po wylaniu odczynnika należy splukać go dużą ilością wody, aby zapobiec gromadzeniu się azcydu w instalacji wodociągowej.³² Istnieje możliwość wystąpienia ogólnoustrojowych reakcji alergicznych u osób wrażliwych.
9. Aby uzyskać więcej informacji dotyczących stosowania tego wyrobu, należy zapoznać się z przewodnikiem użytkownika aparatu BenchMark IHC/ISH oraz instrukcjami obsługi wszystkich wymaganych elementów. Instrukcje te można znaleźć pod adresem navityportal.roche.com.
10. W celu uzyskania informacji na temat zalecanej metody użycia produktu należy skontaktować się z władzami lokalnymi i/lub krajowymi.
11. Oznakowanie dotyczące bezpieczeństwa produktu jest przede wszystkim zgodne z wytycznymi GHS UE. Karta charakterystyki jest dostępna na życzenie profesjonalnego użytkownika.
12. W celu zgłoszenia podejrzenia wystąpienia poważnych incydentów związanych z tym wyrobem należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche i właściwym organem państwa członkowskiego lub kraju, którego rezydentem jest użytkownik.

PROCEDURA BARWNIENIA

Przeciwciała pierwszorzędowe firmy VENTANA opracowano do stosowania w aparatach BenchMark IHC/ISH razem z zestawami detekcyjnymi i akcesoriami firmy VENTANA. Zalecane protokoły barwienia przedstawiono w poniższych tabelach.

Niniejsze przeciwciało zostało zoptymalizowane pod kątem określonych czasów inkubacji, jednak użytkownik jest zobowiązany do walidacji wyników uzyskanych z zastosowaniem tego odczynnika.

Parametry procedur zautomatyzowanych mogą być wyświetlane, drukowane i edytowane zgodnie z procedurą opisaną w przewodniku użytkownika aparatu. Więcej informacji na temat procedur barwienia metodą IHC podano w arkuszu metody zestawu *ultraView DAB Detection Kit*.

Aby uzyskać więcej informacji dotyczących prawidłowego użytkowania tego wyrobu, należy zapoznać się z arkuszem metody dozownika wbudowanego powiązanym z P/N 790-7167.

UWAGA: Podsumowanie procedur barwienia zawiera Tab 1 (ocena pod kątem statusu HER2-dodatniego i niskiego poziomu ekspresji HER2 dla przypadków raka sutka), Tab 2 (ocena wyłącznie pod kątem statusu HER2-dodatniego dla przypadków raka sutka) i Tab 3 (ocena pod kątem statusu HER2-dodatniego dla przypadków raka żołądka). Zalecane etapy protokołu barwienia, w tym kondycjonowanie komórek i inkubacja z przeciwciałami, są takie same dla wszystkich badań przesiewowych pod kątem receptora HER2 w raku sutka; procedury barwienia różnią się jednak pod względem możliwości ich modyfikacji przez użytkownika. W przypadku badania przesiewowego pacjentów pod kątem potencjalnego niskiego poziomu ekspresji HER2 należy zastosować procedurę barwienia podaną w Tab 1. Jeśli celem badania może być zgłoszenie statusu wskazującego na niski poziom ekspresji HER2 (zdefiniowanego jako ocena IHC 1+ lub 2+ (z potwierdzonym statusem braku amplifikacji genu HER2)), należy wykonać procedurę barwienia podaną w Tab 1. Jeśli celem badania jest zgłoszenie wyłącznie statusu HER2-dodatniego (zdefiniowanego jako ocena IHC 3+ lub 2+ z potwierdzonym statusem amplifikacji genu HER2), można wykonać procedurę podaną w Tab 1 lub Tab 2. Aby zapewnić jak najlepsze wykorzystanie wyników, zarówno na potrzeby zgłaszania niskiego poziomu ekspresji HER2, jak i statusu HER2-dodatniego w przypadkach raka sutka, zdecydowanie zalecane jest wykorzystanie procedury barwienia podanej w Tab 1.

Procedura barwienia odpowiednia dla wszystkich ocen ekspresji białka HER2, w tym oceny potencjalnej niskiej ekspresji białka HER2 w próbkach tkanki sutka

Protokół i procedura barwienia, których opis zawiera niniejsza sekcja i Tab 1, są odpowiednie do stosowania we wszystkich badaniach przesiewowych dotyczących receptora HER2 w przypadkach raka sutka i muszą być przeprowadzane podczas oceny próbek pacjentów pod kątem możliwości wdrożenia leczenia w związku z potencjalnym niskim poziomem ekspresji HER2. Odstępstwa od zalecanego protokołu barwienia mogą doprowadzić do uzyskania próbek o nieakceptowalnym barwieniu białka HER2 ze zmienioną oceną HER2, szczególnie w przypadkach o niskiej ekspresji białka HER2 (ocena IHC 1+). W szczególności skrócenie lub wydłużenie czasu kondycjonowania komórek podczas barwienia próbek w celu oceny ekspresji białka HER2 może doprowadzić do zmiany ocen HER2, co może przełożyć się na podjęcie nieodpowiednich decyzji w kwestii leczenia pacjentów. Aby ograniczyć ryzyko wystąpienia takiej sytuacji, w przypadku procedury barwienia podanej w Tab 1 zmiana czasu kondycjonowania komórek lub inkubacji z przeciwciałem jest niemożliwa, ponieważ jest to jedyny protokół barwienia, który został zwalidowany do wykorzystania na potrzeby oceny próbek pacjentów o potencjalnie niskim poziomie ekspresji białka HER2.

Tab 1. Protokół barwienia próbek tkanek sutka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) Assay i aparatu BenchMark IHC/ISH, odpowiedni dla wszystkich ocen ekspresji białka HER2, w tym oceny potencjalnej niskiej ekspresji białka HER2.

Typ procedury	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA lub BenchMark ULTRA PLUS
Procedura barwienia	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Przeciwciało (pierwszorzędowe)*	VENTANA HER2 4B5 Ab — 16 min lub CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig — 16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab — 16 min lub CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig — 16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab — 12 min lub CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig — 12 min
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po barwieniu kontrastowym	Bliuing, 4 minuty		

* Jest to warunek zaprogramowany wstępnie i nie jest krokiem dostępnym do wyboru przez użytkownika.

Alternatywne procedury barwienia przeznaczone wyłącznie do oceny pod kątem potencjalnego statusu HER2-dodatniego w próbkach sutka i żołądka

Tab 2 i Tab 3 przedstawiają procedury i protokoły barwienia przeznaczone do oceny pod kątem statusu HER2-dodatniego (definiowanego jako nadekspresja białka, ocena IHC 3+ lub 2+ (z potwierdzonym statusem amplifikacji genu HER2)) i nie są przeznaczone do oceny pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2 (definiowanego jako ocena IHC 1+ lub 2+ (z potwierdzonym statusem braku amplifikacji genu HER2)). Zalecane czasy kondycjonowania komórek i inkubacji z przeciwciałami podane w Tab 2 i Tab 3 nie są zablokowane i mogą zostać zmienione przez użytkownika. Do potencjalnych powodów zmiany parametrów należą różnice w utrwalaaniu i obróbce tkanek (odstępstwa od zalecanej metody utrwalaania lub obróbki próbek), ogólne warunki związane z aparatem i środowiskiem laboratoryjnym oraz preferencje badacza. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utrwalaaniem można znaleźć w dokumencie „Immunohistochemistry Principles and Advances”.³³ Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych protokołów barwienia, są odpowiedzialni za interpretację i walidację wyników badań pacjentów.

Tab 2. Zalecany protokół barwienia próbek tkanek sutka dla testu VENTANA HER2 (4B5) przy użyciu zestawu *ultraView DAB Detection Kit* w aparacie BenchMark IHC/ISH.

Typ procedury	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA lub BenchMark ULTRA PLUS
Procedura barwienia	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>
Odparafinowanie	Wybrane	Wybrane	Wybrane
Cell Conditioning (odstąpienie antygenu)	CC1, łagodne	CC1, łagodne	ULTRA CC1, łagodne
Przeciwciało (pierwszorzędowe)	16 minut, 37°C	16 minut, 37°C	12 minut, 36°C
<i>ultraWash</i>	Wybrane		
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty		

Tab 3. Zalecany protokół barwienia próbek tkanek żołądka dla testu VENTANA HER2 (4B5) przy użyciu zestawu *ultraView DAB Detection Kit* w aparacie BenchMark IHC/ISH.

Typ procedury	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Procedura barwienia	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>	Procedura barwienia z użyciem zestawu <i>ultraView DAB</i>
Odparafinowanie	Wybrane	Wybrane	Wybrane
Cell Conditioning (odstąpienie antygenu)	CC1, łagodne	CC1, łagodne	ULTRA CC1, łagodne
Przeciwciało (pierwszorzędowe)	16 minut, 37°C	16 minut, 37°C	12 minut, 36°C
<i>ultraWash</i>	Wybrane		
Barwienie kontrastowe	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po barwieniu kontrastowym	Bluing, 4 minuty		

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

Kontrolne linie komórkowe

Firma Ventana oferuje sprzedawany oddzielnie produkt — cztery kontrolne linie komórkowe utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie, pocięte na skrawki i umieszczone na pojedynczym dodatnio naładowanym szkiełku. Preparaty PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (P/N 781-2991) mogą być przydatne podczas wstępnej walidacji działania aparatu lub metod obróbki tkanek wykorzystywanych podczas barwienia preparatów przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5). Liczba kopii genu występująca w tych czterech kontrolnych liniach komórkowych została oznaczona za

pomocą hybrydyzacji in situ (Tab 4). Linie komórkowe powinny barwić się w sposób opisany w arkuszu metody preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, pod warunkiem że zostaną poddane obróbce i wybarwione w prawidłowy sposób. Jeśli wskazane wybarwienie nie jest widoczne w odpowiednich rdzeniach tkankowych, szczególnie w kontrolach 1+ i 2+, należy ponownie wybarwić tkanki.

Tab 4. Charakterystyka preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

Wynik HER2 IHC	Linia komórkowa	Stosunek HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* Stosunek HER2/Chr17 jest średnią obliczoną na podstawie wyników fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) przeprowadzonej na trzech partiach preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

TKANKA DO KONTROLI DODATNIEJ

Dodatnia kontrola tkankowa, utrwalona i poddana obróbce w taki sam sposób jak próbki pobrane od pacjenta, musi zostać włączona do badania w przypadku każdego zestawu warunków testowych oraz podczas przeprowadzania każdej procedury barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5). Zgodnie z optymalną praktyką laboratoryjną na preparat, na którym jest tkanka badana, należy dodać skrawek tkanki będący kontrolą dodatnią. To pomoże zidentyfikować wszelkie niepowodzenia związane z nałożeniem odczynników na preparat. Dla optymalnej kontroli jakości najbardziej odpowiednia jest tkanka ze słabym barwieniem dodatnim. Tkanki kontrolne mogą zawierać zarówno elementy dające odczyn dodatni, jak i ujemny, a zatem mogą być stosowane jednocześnie jako dodatnia i ujemna próba kontrolna. Tkanki kontrolne powinny być próbkami świeżo pobranymi z autopsji, biopsji lub chirurgicznie i powinny zostać przygotowane lub utrwalone jak najszybciej w identyczny sposób jak skrawki badane.

Takie tkanki mogą być wykorzystywane do monitorowania wszystkich kroków procedury, od przygotowania tkanki po jej barwienie. Użycie skrawka tkanki utrwalonego lub poddanego obróbce w sposób inny niż próbka badana umożliwia kontrolę wszystkich odczynników oraz kroków metody z wyjątkiem utrwalań i obróbki tkanki. Aby zagwarantować czułość systemu nawet na niewielki stopień rozkładu odczynnika lub nieznaczne problemy z metodą IHC, najlepiej wybrać tkankę o potwierdzonym słabym, ale dodatnim barwieniu. Zazwyczaj jednak tkanka nowotworowa o dodatnim statusie HER2 wykazuje silne barwienie dodatnie ze względu na charakter występującej w niej patologii (nadekspresja).

Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania jakości działania odczynników i aparatu, a nie pomocniczo do określania swojej diagnozy dla tkanek badanych. Jeżeli nie udaje się potwierdzić dodatniego wybarwienia w preparatach dodatnich kontroli tkankowych, należy uznać, że wyniki próbki testowej są nieważne.

Przykładem dodatniej kontroli dla testu VENTANA HER2 (4B5) jest tkanka inwazyjnego raka sutka o znanym słabym dodatnim barwieniu pod kątem białka HER2 lub słabo dodatnia tkanka raka żołądka. Składników tkankowych dających odczyn dodatni (barwienie błonowe komórek nowotworowych) używa się w celu potwierdzenia naniesienia przeciwciała na preparat oraz prawidłowego działania aparatu.

Tkanka do kontroli ujemnej

Ten sam preparat, który służył jako tkanka do kontroli dodatniej (inwazyjny rak przewodowy lub zrazikowy sutka lub rak żołądka), może być również używany do kontroli ujemnej. Podczas barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym składniki, które nie ulegają barwieniu (otaczające podścielisko, komórki limfoidalne i naczynia krwionośne), nie powinny wykazywać swojego barwienia, powinny natomiast wskazywać na obecność swojego barwienia tła (barwienia fałszywie dodatniego). Należy używać tkanek o znanym odczynie ujemnym, które zostały utrwalone, poddane obróbce i zatopione w taki sam sposób jak próbki pacjentów.

Odczynnik do kontroli ujemnej

Z każdą próbką należy stosować odczynnik do kontroli ujemnej, aby wspomóc interpretację wyników. W celu oceny barwienia nieswoistego zamiast przeciwciała pierwszorzędowego używany jest odczynnik do kontroli ujemnej. Preparat należy wybarwić przeciwciałem CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Okres inkubacji

z odczynnikiem do kontroli ujemnej powinien być taki sam jak okres inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędownym.

Niewyjaśnione rozbieżności

Niewyjaśnione rozbieżności w tkankach kontrolnych należy niezwłocznie zgłosić lokalnemu przedstawicielowi działu pomocy technicznej. Jeśli kontrola jakości nie spełnia wymogów, wyniki pacjenta są nieważne. Należy zapoznać się z częścią „Rozwiązywanie problemów”. Zidentyfikować i rozwiązać problem, a następnie powtórzyć test dla próbek pacjenta.

Weryfikacja badania

Przed pierwszym użyciem przeciwciała lub systemu do barwienia w procedurze diagnostycznej należy zweryfikować swoistość przeciwciała poprzez wybarwienie serii tkanek dodatnich i ujemnych, dla których znana jest charakterystyka wyników badań immunohistochemicznych (patrz „Procedury kontroli jakości” wyszczególnione wcześniej w tej części ulotki dołączonej do produktu, zalecenia dotyczące kontroli jakości opracowane w ramach programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, zalecenia zawarte w dokumencie Anatomic Pathology Checklist³⁴ i/lub wytyczne CLSI Approved Guideline³⁵). Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciała oraz przy każdej zmianie parametrów testu. Tkanki raka sutka i raka żołądka o znanym statusie HER2 są odpowiednie do weryfikacji badania.

INTERPRETACJA WYBARWIENIA/OCZEKIWANE WYNIKI

Zautomatyzowana procedura barwienia immunohistochemicznego firmy VENTANA prowadzi do wytrącania brązowego produktu reakcji (DAB) w miejscach występowania antygenów zlokalizowanych przez przeciwciało testu VENTANA HER2 (4B5). Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w procedurach immunohistochemicznych musi dokonać oceny odczynów kontroli tkankowych i zakwalifikować produkt barwienia do badania.

Kontrole dodatnie

Wybarwioną tkankę do kontroli dodatniej należy ocenić jako pierwszą, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność produktu reakcji o odpowiedniej barwie w błonie komórkowej komórek docelowych wskazuje dodatnią reaktywność tkanki. W zależności od czasu inkubacji i mocy stosowanej hematoksyliny, w wyniku barwienia kontrastowego jądra komórek przybiorą barwę od bładoniebieskiej do ciemnoniebieskiej. Nadmierne lub niepełne wybarwienie kontrastowe może uniemożliwić właściwą interpretację wyników.

Jeśli nie udaje się potwierdzić dodatniego barwienia w preparacie tkanki do kontroli dodatniej, należy uznać, że wyniki próbek badanych są nieważne.

Tkanki do kontroli ujemnej

Po ocenie tkanki do kontroli dodatniej należy ocenić tkankę do kontroli ujemnej w celu weryfikacji swegoistego wyznakowania docelowego antygeny przez przeciwciało pierwszorzędowne. Brak swoistego barwienia w tkance do kontroli ujemnej świadczy o braku reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami lub składnikami komórkowymi. Jeśli tkanka zostanie wybarwiona kontrastowo, wokół komórki może wystąpić barwienie tzw. przestrzeni śródmiąższowej. Jeśli w tkance do kontroli ujemnej zachodzi swoiste barwienie, wyniki uzyskane dla próbek pacjentów należy uznać za nieważne.

Odczynniki do kontroli ujemnej

Nieswoiste barwienie, jeśli występuje, będzie mieć wygląd rozlany. W skrawkach tkanek, które zostały nadmiernie utrwalone w formalinie, może być również obserwowane sporadyczne, lekkie wybarwienie tkanki łącznej. W celu interpretacji wyników barwienia należy się posłużyć nienaruszonymi komórkami; komórki nekrotyczne lub zdegenerowane często barwią się nieswoiście.

Tkanka pobrana od pacjenta

Próbki pacjentów należy oceniać jako ostatnie. Intensywność wybarwienia dodatniego należy oceniać względem barwienia tła odczynnikami do kontroli ujemnej. Jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że docelowy antygen nie został wykryty — nie można jednak wykluczyć obecności antygeny w badanych komórkach lub tkankach. Przy interpretacji wyników badań immunohistochemicznych należy również ocenić cechy morfologiczne każdej próbki tkanki na podstawie skrawka wybarwionego hematoksylina i eozyną. Cechy morfologiczne próbki pacjenta i właściwe dane kliniczne muszą zostać zinterpretowane przez wykwalifikowanego patomorfologa.

Przed przystąpieniem do interpretacji wyników wykwalifikowany patomorfolog z doświadczeniem w procedurach immunohistochemicznych musi dokonać oceny dodatnich i ujemnych kontroli i zakwalifikować wybarwiony preparat do badania.

Zasady oceniania przyjęte na potrzeby interpretacji wyników barwienia tkanek raka sutka przy użyciu przeciwciała VENTANA anti-HER2 (4B5) Antibody

Kryteria barwienia przedstawiono w tabelach poniżej. Bardziej szczegółowe opisy wraz ze zdjęciami wyników barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) można znaleźć w Podręczniku interpretacji barwienia tkanek raka sutka i żołądka przeciwciałem VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (P/N 1021957PL).

Tab 5. Kryteria dla intensywności i wzoru barwienia błony komórkowej w przypadku tkanek raka sutka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) i procedury barwienia przedstawionej w Tab 1.

Wzór barwienia	Ocena HER2 (4B5) (zgłosić lekarzowi prowadzącemu)	Wykorzystanie procedury barwienia przedstawionej w Tab 1: zalecany zgłaszany status	Zastosowanie kliniczne
Nie zaobserwowano wybarwienia błony lub Blade, częściowe wybarwienie błony w maksymalnie 10% komórek rakowych	0	HER2-negatywny	Brak
Blade, częściowe wybarwienie błony w ponad 10% komórek rakowych	1+	Niska ekspresja HER2	ENHERTU® (trastuzumab derukstekan)
Kompletne wybarwienie błony o intensywności od słabej do umiarkowanej w ponad 10% komórek rakowych	2+* Test dodatkowy: brak amplifikacji genu HER2	Niska ekspresja HER2	
	2+* Test dodatkowy: amplifikacja genu HER2	HER2-dodatni / nadekspresja	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtanzyna)
Intensywne, kompletne wybarwienie błony w ponad 10% komórek rakowych	3+	HER2-dodatni / nadekspresja	

* Zaleca się przeprowadzenie testu dodatkowego w celu oceny pod kątem amplifikacji genu zgodnie z wytycznymi ASCO/CAP

Tab 6. Kryteria dla intensywności i wzoru barwienia błony komórkowej w przypadku tkanek raka sutka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) RxDx i procedury barwienia przedstawionej w Tab 2.

Wzór barwienia	Ocena HER2 (4B5) (zgłosić lekarzowi prowadzącemu)	Wykorzystanie procedury barwienia przedstawionej w Tab 2: zalecany zgłaszany status	Zastosowanie kliniczne
Nie zaobserwowano wybarwienia błony lub Blade, częściowe wybarwienie błony w maksymalnie 10% komórek rakowych	0	HER2-negatywny	Brak

Wzór barwienia	Ocena HER2 (4B5) (zgłosić lekarzowi prowadzącemu)	Wykorzystanie procedury barwienia przedstawionej w Tab 2: zalecany zgłaszany status	Zastosowanie kliniczne
Blade, częściowe wybarwienie błony w ponad 10% komórek rakowych	1+	HER2-negatywny	
Kompletne wybarwienie błony o intensywności od słabej do umiarkowanej w ponad 10% komórek rakowych	2+*	HER2-negatywny	
	Test dodatkowy: brak amplifikacji genu HER2		
Intensywne, kompletne wybarwienie błony w ponad 10% komórek rakowych	2+*	HER2-dodatni / nadekspresja	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtanzyna)
	Test dodatkowy: amplifikacja genu HER2		
	3+	HER2-dodatni / nadekspresja	

* Zaleca się przeprowadzenie testu dodatkowego w celu oceny pod kątem amplifikacji genu zgodnie z wytycznymi ASCO/CAP

Zasady oceniania przyjęte na potrzeby interpretacji wyników barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu przeciwciała VENTANA anti-HER2 (4B5)

Tkanki raka żołądka, które zostały uznane za dodatnie pod względem nadekspresji białka HER2, muszą spełniać kryteria progowe dla intensywności i wzoru barwienia błony

Tab 7. Kryteria dla intensywności i wzoru barwienia błony komórkowej w przypadku tkanek raka żołądka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) i procedury barwienia przedstawionej w Tab 3.

Wzór barwienia — próbka z resekcji	Wzór barwienia — próbka z biopsji	Ocena (zgłosić lekarzowi prowadzącemu)	Ocena barwienia HER2	Zastosowanie kliniczne
Brak reaktywności lub reaktywność błonowa w < 10% komórek guza	Brak reaktywności lub reaktywność błonowa w jakichkolwiek komórkach guza	0	HER2-negatywny	Brak
Słaba/ledwie dostrzegalna reaktywność błonowa w ≥ 10% komórek guza; reaktywność występuje tylko w części błony komórkowej	Skupisko komórek guza* ze słabą/ledwie dostrzegalną reaktywnością błonową niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	1+	HER2-negatywny	
Kompletna, podstawno-boczna lub boczna reaktywność błonowa o intensywności od słabej do umiarkowanej w ≥ 10% komórek rakowych	Skupisko komórek guza* z kompletną, podstawno-boczną lub boczną reaktywnością błonową o intensywności od słabej do średniej niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	2+** Test dodatkowy: brak amplifikacji genu HER2	HER2-negatywny	HERCEPTIN (trastuzumab)
		Test dodatkowy: amplifikacja genu HER2	HER2-dodatni / nadekspresja	
Silna, kompletna, podstawno-boczna lub boczna reaktywność błonowa w ≥ 10% komórek rakowych	Skupisko komórek guza* z silną, kompletną, podstawno-boczną lub boczną reaktywnością błonową niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	3+	HER2-dodatni / nadekspresja	

* ≥ 5 przylegających komórek

** Zaleca się porównanie z metodą ISH

OGRANICZENIA METODY

Ograniczenia ogólne

- Metoda immunohistochemiczna to wieloetapowy proces diagnostyczny, który wymaga odbycia specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich

komórkowej (wynik co najmniej 2+ w skali od 0 do 3+) oraz procentowej zawartości dodatnich komórek nowotworowych. Barwienie musi być zlokalizowane w obrębie błony komórkowej, ale nie musi być całkowicie obwodowe, ponieważ regularnie obserwowane jest barwienie podstawno-boczne, które należy uwzględnić w ocenie. Wybarwienie cytoplazmy i/lub jądra komórkowego może być obecne, lecz nie jest uwzględniane podczas oceny dodatniego wybarwienia preparatu. W tkankach raka żołądka procentowa zawartość dodatnich komórek nowotworowych jest różna w przypadku próbek biopsyjnych (≥ 5 przylegających komórek) i próbek z resekcji (≥ 10%).

Podczas ustalania wytycznych oceny immunohistochemicznego barwienia tkanek raka żołądka na potrzeby określenia statusu HER2 należy pamiętać, że chociaż silne barwienie błonowe wskazuje na nadekspresję białka HER2 w komórkach nowotworowych, nie musi ono być całkowicie obwodowe.³⁶

Odnawiano przypadki tkanek raka żołądka wykazujące rozproszony odczyn cytoplazmatyczny z towarzyszącym barwieniem jądrowym lub bez barwienia tego typu.³⁷ Do oceny nadekspresji białka HER2 w raku żołądka należy wykorzystywać jedynie barwienie błonowe.

W ramach barwienia immunohistochemicznego przy użyciu klonu 4B5 komórki prawidłowej błony śluzowej żołądka oraz rzadziej komórki nowotworowe raka żołądka i raka połączenia przełykowo-żołądkowego mogą wykazywać wzór barwienia cytoplazmatycznego i jądrowego. Przyczyna i znaczenie barwienia cytoplazmatycznego i jądrowego tych komórek są obecnie nieznane. Opisanego wzoru barwienia nie należy mylić z odrębnym barwieniem błonowym, które wskazuje na dodatni status HER2 w komórkach nowotworowych.

Bardziej szczegółowe opisy wraz ze zdjęciami mikroskopowymi wyników barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) można znaleźć w Podręczniku interpretacji barwienia tkanek raka sutka i żołądka przeciwciałem VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (P/N 1021957PL).

odczynników, doboru tkanek, utrwalania, obróbki, przygotowania preparatu do badania immunohistochemicznego oraz interpretacji wyników barwienia.

- Wybarwienie tkanki zależy od sposobu postępowania z tkanką i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemycanie, suszenie, podgrzewanie, wykonywanie skrawków lub

- zanieczyszczenie próbki innymi tkankami lub płynami może prowadzić do powstania artefaktów, wychwytywania przeciwciał lub uzyskania fałszywie ujemnych wyników. Niespójne wyniki mogą być skutkiem różnic w metodach utrwalania i zatapiania lub naturalnych nieregularności w obrębie tkanki.
- Nadmierne lub niepełne wybarwienie kontrastowe może uniemożliwić właściwą interpretację wyników.
 - Interpretacja kliniczna każdego dodatniego wybarwienia lub jego braku musi być dokonywana w kontekście danych z wywiadu klinicznego, cech morfologicznych tkanki oraz innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna każdego wybarwienia lub jego braku musi być uzupełniona badaniami morfologicznymi i właściwymi kontrolami, jak również innymi testami diagnostycznymi. Wykwalifikowany patomorfolog ma obowiązek zapoznać się z działaniem przeciwciał i odczynników oraz metodami interpretacji wzoru barwienia w wybarwionych preparatach. Barwienie musi być wykonywane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patomorfologa odpowiedzialnego za ocenę wybarwionych preparatów i zapewnienie adekwatności kontroli dodatnich i ujemnych.
 - Przeciwciała i odczynniki firmy VENTANA są dostarczane w rozcieńczeniu optymalnym do użytku, gdy przestrzegane są dostarczone instrukcje. Wszelkie odchylenia od zalecanych procedur badawczych mogą doprowadzić do unieważnienia oczekiwanych wyników. Do badania należy włączyć odpowiednie kontrole i udokumentować ten fakt. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, muszą przyjąć odpowiedzialność za interpretację wyników badań pacjenta.
 - Produkt ten nie jest przeznaczony do stosowania w cytometrii przepływowej; nie określono charakterystyki wyników dla takiego zastosowania.
 - Odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje w uprzednio niebadanych tkankach. Nie można całkowicie wyeliminować możliwości wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w przebadanych grupach tkanek ze względu na biologiczną zmienność ekspresji antygenu w nowotworach lub innych tkankach patologicznych.³⁸ W przypadku wystąpienia nieoczekiwanych reakcji należy udokumentować ten fakt i skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.
 - Tkanki pochodzące od osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie peroksydazą chrzanową.³⁹
 - Fałszywie dodatnie wyniki mogą być obserwowane z powodu nieimmunologicznego wiązania białek lub produktów reakcji substratów. Mogą być one również spowodowane aktywnością pseudoperoxydazy (erytrocyty), aktywnością endogennej peroksydazy (cytochrom C) lub obecnością białyn endogennej (na przykład: wątroba, mózg, sutek, nerka) w zależności od typu zastosowanego barwnika immunologicznego.⁴⁰
 - Jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że docelowy antygen nie został wykryty — nie można jednak wykluczyć obecności antygenu w badanych komórkach lub tkankach.

Szczegółne ograniczenia

- To przeciwciało zostało zoptymalizowane zgodnie ze wskazaniami, które przedstawiają Tab 1 i Tab 2 dla aparatów BenchMark i odczynników wykorzystywanych do detekcji. Odstępstwa od zalecanych protokołów barwienia, które przedstawiają Tab 1 i Tab 2, mogą doprowadzić do uzyskania próbek o nieakceptowalnym wybarwieniu odczynnikiem Negative Reagent Control (NRC) i próbek wybarwionych przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) ze zmienioną oceną HER2. Wydłużenie czasu inkubacji z przeciwciałem prawdopodobnie spowoduje nieakceptowalne wybarwienie przy użyciu odczynnika NRC, które uniemożliwiłoby ocenę próbki wybarwionej przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5). Skrócenie lub wydłużenie czasu kondycjonowania komórek podczas barwienia próbek przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) najprawdopodobniej doprowadzi do zmiany ocen HER2, co może przełożyć się na podjęcie nieodpowiednich decyzji w kwestii leczenia pacjentów. Więcej informacji na temat zmiennych związanych z utrwalaniem można znaleźć w dokumencie „Immunohistochemistry Principles and Advances”.³³
- Przeciwciało stosowane w połączeniu z zestawami detekcyjnymi i akcesoriami firmy VENTANA umożliwia detekcję antygenu, który przetrwa rutynowe procesy utrwalania w formalinie, obróbki tkanek i wykonywania skrawków. Użytkownicy, którzy odstępują od zalecanych procedur badawczych, są odpowiedzialni za interpretację i walidację wyników badań pacjenta.

- Preparaty należy niezwłocznie wybarwić, ponieważ antygenowość ciętych skrawków tkanek może z czasem ulegać osłabieniu, a także pogorszyć się w wyniku działania czynników środowiskowych podczas długotrwałego przechowywania. Preparaty wysuszone na powietrzu należy osuszyć za pomocą środka suszącego i przechowywać w temperaturze 2–8°C. Wyniki badań przemawiają za tym, że na niewybarwionych preparatach antygen pozostaje stabilny przez co najmniej 45 dni. Laboratoria powinny zweryfikować ten okres trwałości we własnym środowisku, jeśli wymagane jest korzystanie z preparatów starszych niż 45 dni.
- Szpik kostny nie został zbadany pod kątem swoistości. Przed interpretacją wyników użytkownik powinien określić, czy powyższe tkanki zostały wybarwione w odpowiedni sposób.
- W ramach barwienia immunohistochemicznego przy użyciu klonu 4B5 komórki prawidłowej błony śluzowej żołądka oraz rzadziej komórki nowotworowe raka żołądka i raka połączenia przełykowo-żołądkowego mogą wykazywać wzór barwienia cytoplazmatycznego i jądrowego. Przyczyna i znaczenie barwienia cytoplazmatycznego i jądrowego tych komórek są obecnie nieznane. Opisanego wzoru barwienia nie należy mylić z odrębnym barwieniem błonowym, które wskazuje na dodatni status HER2 w komórkach nowotworowych.
- Niektóre testy mogą nie być zarejestrowane na każdym aparacie. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.
- Zgłaszano, że progresja do choroby przerzutowej lub chemioterapia neoadiuwantowa prowadzą do zmiany statusu HER2. W oparciu o te obserwacje uzasadnione może być uzyskanie świeżej próbki w celu określenia statusu HER2 w czasie leczenia, a nie poleganie na historycznym statusie HER2.⁴¹

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Przeprowadzono badania barwienia pod kątem jego czułości, swoistości i precyzji. Wyniki tych badań zamieszczono poniżej.

SKUTECZNOŚĆ ANALITYCZNA

Czułość i swoistość

Czułość/swoistość testu VENTANA HER2 (4B5) określono na podstawie badania, podczas którego nie wykazano swobodnego zabarwienia błony w większości prawidłowych tkanek. Wyniki barwienia przedstawiono w Tab 8. Czułość i swoistość testu VENTANA HER2 (4B5) określono również na podstawie badania, podczas którego nie wykazano swobodnego zabarwienia błony w większości tkanek nowotworowych. Wyniki barwienia przedstawiono w Tab 9. Barwienie w celu określenia czułości i swoistości testu przeprowadzono, używając protokołu zestawu /VIEW DAB Detection Kit w aparacie BenchMark XT lub protokołu zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit w aparacie BenchMark ULTRA.

Wystąpienie dodatniego barwienia w komórkach nabłonka migdałków, nabłonka przełyku, gruczołu krokowego, pęcherza moczowego, nerwu obwodowego, przytarczycy, raka sutka, gruczolakoraka żołądka, okrężnicy oraz raka jajnika jest zgodne z wynikami dotyczącymi ekspresji białka HER2 opisanymi w literaturze.

Tab 8. Czułość/swoistość testu VENTANA HER2 (4B5) wyznaczono, wykonując badania na próbkach prawidłowych tkanek FFPE.

Tkanki	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków	Tkanki	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Mózg	0/6	Jelito cienkie	0/6
Mózdzek	0/6	Okrężnica	0/46
Nadnercze	0/6	Wątroba	0/6
Jajnik	0/6	Gruczoł ślinowy	0/3
Trzustka	0/6	Język	0/3
Węzeł chłonny	0/12	Nerka	0/6
Przysadka mózgowa	0/5	Gruczoł krokowy	1/6
Jądro	0/6	Pęcherz moczowy ^b	3/3
Tarczycza	0/6	Odbytnica	0/6

Tkanki	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków	Tkanki	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Sutek	0/14	Gruzoł przytarczowy ^c	4/6
Śledziona	0/6	Endometrium	0/3
Migdałek ^a	3/6	Macica	0/3
Grasica	0/5	Szyjka macicy	0/5
Szpik kostny	0/3	Śluzówka kanału szyjki macicy	0/1
Płuco	0/6	Mięsień szkieletowy	0/6
Serce	0/5	Skóra	0/6
Osierdzie	0/3	Nerw	2/6
Przelyk	1/6	Mezotelium	0/3
Żołądek	0/11	Nd.	Nd.

^a Barwienie ogniskowe powierzchni komórek nabłonkowych

^b Barwienie błonowe powierzchniowych komórek baldaszkowatych

^c Ogniskowe barwienie błonowe

Tab 9. Czułość/swoistość testu VENTANA HER2 (4B5) wyznaczono, wykonując badania na różnych próbkach nowotworowych tkanek FFPE.

Nowotwór	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Glejak (mózgu)	0/2
Oponiak (mózgu)	0/1
Skąpodrzewiak (mózgu)	0/1
Gruzołakorak surowicy (jajnika)	0/2
Rak, BNO (bliżej nieokreślony) (jajnika)	1/2
Nowotwór neuroendokrynnny (trzustki)	0/1
Gruzołakorak (trzustki)	0/1
Rak, BNO (trzustki)	0/3
Nasieniak (jąder)	0/1
Rak zarodkowy (jąder)	0/1
Rak rdzeniasty (tarczycy)	0/1
Rak brodawkowaty (tarczycy)	0/1
Rak, BNO (tarczycy)	0/3
Mikroinwazyjny rak przewodowy (sutka)	2/2
Inwazyjny rak przewodowy (sutka)	44/98
Rak, BNO (sutka)	1/4
Rak drobnokomórkowy (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (płuca)	0/1
Rak, BNO (płuca)	0/2
Gruzołakorak (płuca)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (przelyku)	0/1
Gruzołakorak (przelyku)	0/1

Nowotwór	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Gruzołakorak śluzowy (żołądka)	0/4
Gruzołakorak (żołądka)	8/88
Rak z komórek sygnetowatych (żołądka)	0/4
Rak, BNO (żołądka)	0/3
Gruzołakorak (jelita cienkiego)	0/1
Guz podścieliska przewodu pokarmowego (jelita cienkiego)	0/1
Gruzołakorak (okreźnicy)	0/32
Guz podścieliska przewodu pokarmowego (okreźnicy)	0/1
Rak, BNO (okreźnicy)	1/3
Gruzołakorak (odbytnicy)	1/5
Guz podścieliska przewodu pokarmowego (odbytnicy)	0/1
Czerniak (odbytnicy)	0/1
Rak wątrobowokomórkowy (wątroby)	0/3
Wątrobiak płodowy (wątroby)	0/1
Rak, BNO (wątroby)	0/3
Rak jasnokomórkowy (nerki)	0/1
Rak, BNO (nerki)	0/5
Gruzołakorak (gruczołu krokowego)	0/2
Rak, BNO (gruczołu krokowego)	0/3
Mięśniak gładkokomórkowy	0/3
Gruzołakorak (macicy)	0/1
Rak jasnokomórkowy (macicy)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (szyjki macicy)	0/2
Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy zarodkowy (mięśnia prążkowanego)	0/1
Rak podstawnokomórkowy (skóry)	0/1
Rak płaskonabłonkowy (skóry)	1/1
Nerwiakowłóknik (łędźwiowy)	0/1
Nerwiak zarodkowy (przestrzeni zaotrzewnowej)	0/1
Międzybłonniak (otrzewnej)	0/1
Mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy wielopostaciowy (otrzewnej)	0/1
Chłoniak, BNO	0/3
Chłoniak z komórek B, BNO (ślędziony)	0/1
Chłoniak z komórek B, BNO (węzła chłonnego)	0/2
Chłoniak Hodgkina (węzła chłonnego)	0/1
Rak nabłonka dróg moczowych (pęcherza moczowego)	1/1
Mięśniakomięsak gładkokomórkowy (pęcherza moczowego)	0/1
Kostniakomięsak (kości)	0/1
Mięśniakomięsak gładkokomórkowy (mięśnia gładkiego)	0/1
Gruzołakorak odbytnicy (przerzutowy)	0/1
Gruzołakorak okreźnicy (przerzutowy)	0/7

Nowotwór	Liczba dodatnich/ wszystkich przypadków
Gruzołakorak śluzowy okrężnicy (przerzutowy)	0/1
Czerniak	0/2
Nowotwór neuroendokrynnny, BNO	0/2
Mięsak, BNO	0/2
Rak niezróżnicowany, BNO	0/1

Skuteczność analityczna — rak sutka o niskim poziomie ekspresji HER2

Powtarzalność i precyzja pośrednia dla badania pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2 w aparacie BenchMark ULTRA

Do badania powtarzalności i precyzji pośredniej wykorzystano dwadzieścia cztery przypadki raka sutka obejmujące cały zakres barwienia HER2 IHC. Badanie zostało zaprojektowane w celu weryfikacji precyzji barwienia tkanek raka sutka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) w następujących warunkach.

Trzy partie testu VENTANA HER2 (4B5) (między partiami przeciwciała)

Trzy partie zestawu *ultraView* DAB IHC Detection Kit (między partiami zestawu detekcyjnego)

W trzech dniach (między dniami)

W trzech aparatach BenchMark ULTRA (między aparatami)

Dla wszystkich warunków testowanych w badaniu precyzji pośredniej (w ramach cyklu)

Na podstawie zagregowanych próbek każdej próbce przypisano jedną wartość modalną na każdy warunek badania, taki jak „między partiami przeciwciała”, „między partiami zestawu detekcyjnego”, „między aparatami” i „między dniami”. W przypadku warunku „w ramach cyklu” każdą próbkę porównywano z jej powtórzeniami dla danego cyklu.

Wszystkie preparaty zostały zaślepienie i poddane randomizacji, a następnie ocenione zgodnie z kryteriami dla intensywności i wzoru barwienia błony komórkowej przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) (Tab 5). Podsumowanie wyników zawiera Tab 10.

Tab 10. Powtarzalność i precyzja pośrednia barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Powtarzalność/ Precyzja	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między partiami przeciwciała	PPA	96/96	100.0	(96.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	144/144	100.0	(97.4, 100.0)
Między zestawami detekcyjnymi	PPA	93/96	96.9	(92.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	141/144	97.9	(94.4, 100.0)
Między aparatami (BenchMark ULTRA)	PPA	95/96	99.0	(96.7, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	143/144	99.3	(97.9, 100.0)
Między dniami	PPA	94/96	97.9	(93.3, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	142/144	98.6	(95.8, 100.0)
W ramach cyklu	PPA	142/144	98.6	(96.5, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	214/216	99.1	(97.7, 100.0)

Powtarzalność/ Precyzja	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI

Uwaga: Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA), procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA), procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA).

Uwaga: Dwustronny 95-procentowy przedział ufności (CI) obliczono przy użyciu metody percytylowej bootstrap, korzystając z 2000 próbek typu bootstrap. Przedziały ufności dla 100-procentowej PPA, NPA i OPA obliczono przy użyciu metody oceny Wilsona.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego nie pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2, a oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia celowanego odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2.

Badanie porównywania aparatów BenchMark ULTRA, Benchmark XT i Benchmark GX — niski poziom ekspresji HER2

Do badania precyzji pośredniej wykorzystano dziesięć przypadków raka sutka obejmujących cały zakres barwienia HER2 IHC. Badanie zostało zaprojektowane w celu weryfikacji precyzji barwienia tkanek raka sutka przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) wykonywanego w wielu aparatach i na wielu platformach.

Na podstawie zagregowanych próbek każdej próbce przypisano jedną wartość modalną na każdy z warunków badania. Każdą próbkę porównywano z jej powtórzeniami dla danego cyklu. Wszystkie preparaty zostały zaślepienie i poddane randomizacji, a następnie ocenione zgodnie z kryteriami dla intensywności i wzoru barwienia błony komórkowej przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) (Tab 5). Podsumowanie wyników zawiera Tab 11.

Tab 11. Powtarzalność i precyzja pośrednia barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Powtarzalność/ Precyzja	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między platformami (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Między aparatami (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Między aparatami (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Między aparatami (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Uwaga: Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA), procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA), procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA).

Uwaga: Dwustronny 95-procentowy przedział ufności (CI) obliczono przy użyciu metody percytylowej bootstrap, korzystając z 2000 próbek typu bootstrap. Przedziały ufności dla 100-procentowej PPA, NPA i OPA obliczono przy użyciu metody oceny Wilsona.

Powtarzalność/ Precyzja	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego nie pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2, a oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia celowanego odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2.

Precyzja badacza dla badania pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2 w aparacie BenchMark ULTRA

Określono precyzję badacza oraz precyzję między badaczami poprzez ocenę zgodności statusów wskazujących na niski poziom ekspresji HER2 wyznaczonych przez trzech badaczy (precyzja między badaczami) oraz przez poszczególnych badaczy (precyzja badacza). Do badania wykorzystano 100 przypadków raka sutka obejmujących cały zakres barwienia HER2 IHC. Próbkę zostały zaślepione i poddane randomizacji, a następnie ocenione pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2 zgodnie ze wzorem barwienia błony komórkowej przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) (Tab 5). Badacze oceniali wszystkie próbki dwukrotnie, a odstęp między odczytami wynosił co najmniej dwa tygodnie. Tab 12 przedstawia podsumowanie zgodności wyników określanych w badaniach precyzji badacza oraz precyzji między badaczami.

Tab 12. Precyzja badacza i precyzja między badaczami dla barwienia z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Precyzja	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Badacza	APA	312/333	93.7	(90.9, 96.4)
	ANA	246/267	92.1	(88.0, 95.6)
	OPA	279/300	93.0	(90.0, 96.0)
Między badaczami	APA	300/332	90.4	(85.8, 94.3)
	ANA	236/268	88.1	(82.1, 93.0)
	OPA	268/300	89.3	(84.7, 94.0)

Uwaga: Średnia zgodność wyników dodatnich (APA), średnia zgodność wyników ujemnych (ANA), procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA).

Uwaga: Dwustronny 95-procentowy przedział ufności (CI) obliczono przy użyciu metody percyntylowej bootstrap, korzystając z 2000 próbek typu bootstrap.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego nie pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2, a oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia celowanego odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2.

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej podczas oceny pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2 przy użyciu aparatu BenchMark ULTRA

Przeprowadzono badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) w celu wykazania odtwarzalności testu wykonywanego w celu określenia statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 w przypadkach raka sutka. W badaniu wykorzystano 28 archiwalnych próbek tkanek FFPE raka sutka, z których usunięto dane identyfikacyjne, a następnie barwiono w trzech aparatach BenchMark ULTRA każdego dnia w ciągu pięciu nienastępujących bezpośrednio po sobie dni w okresie 20 dni w trzech zewnętrznych laboratoriach. Próbkę reprezentowały zakres barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5).

Każdy zestaw 5 wybarwionych preparatów przypadający na próbkę oraz na dzień barwienia został poddany randomizacji i oceniony względem statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy na ośrodek). Wyniki dotyczące

statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 uzyskane dla próbek przez wszystkich badaczy, we wszystkich ośrodkach i dniach zostały połączone i przeanalizowane, a następnie porównane z wartościami modalnymi uzyskanymi przez badaczy dla tych samych próbek w celu określenia ogólnej odtwarzalności wyników dotyczących statusu niskiego poziomu ekspresji HER2. Podsumowanie zgodności wyników wszystkich obserwacji możliwych do oceny pod kątem niskiej ekspresji białka HER2 przy użyciu wartości modalnych uzyskanych przez badaczy na poziomie próbki jako odniesienia przedstawia Tab 13.

Tab 13. Odtwarzalność międzylaboratoryjna zgodności wszystkich wyników ogółem dla barwienia z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Ogółem	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
W obrębie ośrodka	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
Badacza	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)

Uwaga: Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA), procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA), procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA).

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percyntylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego nie pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2, a oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego pozwalały one na kwalifikację lub potencjalną kwalifikację pacjentów do leczenia celowanego odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2.

Dodatkowo uzyskane statusy niskiej ekspresji białka HER2 porównywano parami między ośrodkami, badaczami i dniami. Podsumowanie wyników tego badania zawiera Tab 14. Uzyskane dane wskazują na odtwarzalność testu w 5 dniach i 3 ośrodkach oraz wśród 6 badaczy.

Tab 14. Zgodność porównywanych parami wyników w ramach badania odtwarzalności międzylaboratoryjnej dla barwienia z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między ośrodkami	APA	7884/8102	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	8240/8458	97.4	(95.7, 98.8)
	OPA	8062/8280	97.4	(95.5, 98.8)
Między badaczami	APA	398/409	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	414/425	97.4	(95.6, 98.8)
	OPA	406/417	97.4	(95.5, 98.8)

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między dniami	APA	1580/1620	97.5	(95.9, 98.9)
	ANA	1652/1692	97.6	(96.2, 98.9)
	OPA	1616/1656	97.6	(96.1, 98.9)

Uwaga: Średnia zgodność wyników dodatnich (APA), średnia zgodność wyników ujemnych (ANA), procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA).

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percentylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego nie pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2, a oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ zgodnie z projektem badania klinicznego pozwalały one na kwalifikację pacjentów do leczenia celowanego odpowiedniego dla przypadków z niską ekspresją HER2.

Skuteczność analityczna — przypadki tkanek sutka o niskim poziomie ekspresji HER2

Zgodność między aparatami BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS — niski poziom ekspresji HER2

W badaniu zgodności wzięły udział trzy laboratoria w celu oceny równoważności skuteczności aparatów BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS. W przypadku analizy statystycznej niskich poziomów ekspresji HER2 160 (80 dodatnich i 80 ujemnych przypadków, w tym 16 przypadków granicznych) przypadków zostało wstępnie wybranych do analizy przed odczytami patomorfologów. Preparaty tkankowe przygotowane ze wszystkich przypadków wybarwiono przy użyciu odczynnika do kontroli ujemnej i testu VENTANA HER2 (4B5) w wewnętrznym laboratorium firmy Roche. Zastosowano aparat BenchMark ULTRA i zalecany protokół barwienia. Niewybarwione preparaty tkankowe ze wszystkich przypadków zostały poddane randomizacji i podzielone na zestawy o takiej samej liczbie w celu wybarwienia w aparacie BenchMark ULTRA PLUS przy użyciu zalecanego protokołu barwienia VENTANA HER2 (4B5). W każdym z ośrodków jeden badacz, który nie znał statusów przypadków, oceniał preparaty wybarwione w aparacie BenchMark ULTRA PLUS i ustalał status białka HER2 (4B5). Wyniki zostały przeanalizowane przez firmę Roche. Podsumowanie wyników zawiera Tab 15.

Tab 15. Wartości zgodności statusów niskiego poziomu ekspresji białka HER2, rozpatrywanych zbiorczo; dla przypadków wybarwionych przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny = wynik ujemny	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny = wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	272	13	25	11	321
Wynik ujemny	8	9	2	298	317
Łącznie	280	22	27	309	638
Odsetek wyników dodatnich, % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	Nd.
n/N			% (95-procentowy CI)		

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny = wynik ujemny	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny = wynik ujemny	Łącznie
PPA	285/302			94.4 (91.6, 96.8)	
NPA	300/336			89.3 (84.3, 94.4)	
OPA	585/638			91.7 (88.5, 94.6)	

Uwaga: PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; OPA = procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem.

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percentylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen IHC.

Uwaga: Podczas zbiorczej analizy zgodności uwzględniono wszystkie przypadki oraz wszystkie odczyty badaczy oceniających wyniki barwienia w aparacie ULTRA PLUS.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ nie kwalifikowały się do badania klinicznego dotyczącego raka sutka o niskim poziomie ekspresji HER2. Oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ kwalifikowały się lub potencjalnie kwalifikowały się do badania klinicznego.

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej aparatu BenchMark ULTRA PLUS — niski poziom ekspresji HER2

Przeprowadzono badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) w celu wykazania odtwarzalności testu wykonywanego w celu określenia statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 w przypadkach raka sutka.

W badaniu wykorzystano 28 archiwalnych próbek tkanek FFPE raka sutka, z których usunięto dane identyfikacyjne, a następnie barwiono w trzech aparatach BenchMark ULTRA PLUS każdego dnia w ciągu pięciu nienastępujących bezpośrednio po sobie dni w okresie 20 dni w trzech zewnętrznych laboratoriach. Próbkę reprezentowały zakres barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5).

Każdy zestaw 5 wybarwionych preparatów przypadający na próbkę oraz na dzień barwienia został poddany randomizacji i oceniony względem statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy na ośrodek). Wyniki dotyczące statusu niskiego poziomu ekspresji HER2 uzyskane dla próbek przez wszystkich badaczy, we wszystkich ośrodkach i dniach zostały połączone i przeanalizowane, a następnie porównane z wartościami modalnymi uzyskanymi przez badaczy dla tych samych próbek w celu określenia ogólnej odtwarzalności wyników dotyczących statusu niskiego poziomu ekspresji HER2. Podsumowanie zgodności wyników wszystkich obserwacji możliwych do oceny pod kątem niskiej ekspresji białka HER2 przy użyciu wartości modalnych uzyskanych przez badaczy na poziomie próbki jako odniesienia przedstawia Tab 16.

Tab 16. Odtwarzalność międzylaboratoryjna zgodności wszystkich wyników ogółem dla barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Analiza pierwszorzędowa/ogółem	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Stratyfikacja według ośrodka	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Stratyfikacja według badacza	PPA	412/425	96.9	(94.8, 98.7)
	NPA	405/415	97.6	(94.9, 100.0)
	OPA	817/840	97.3	(95.2, 98.9)

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percentylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen przypadków.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ nie kwalifikowały się do badania klinicznego dotyczącego raka sutka o niskim poziomie ekspresji HER2. Oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ kwalifikowały się lub potencjalnie kwalifikowały się do badania klinicznego.

Dodatkowo uzyskane statusy HER2 (4B5) porównywano parami między ośrodkami, badaczami i dniami. Zgodnie z danymi, które przedstawia Tab 17, wyniki testu były odtwarzalne w 5 dniach i 3 ośrodkach oraz wśród 6 badaczy.

Tab 17. Odtwarzalność międzylaboratoryjna zgodności wyników porównywanych parami dla barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem niskiego poziomu ekspresji HER2.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między ośrodkami	APA	7982/8440	94.6	(90.3, 97.9)
	ANA	7902/8360	94.5	(90.6, 98.0)
	OPA	7942/8400	94.5	(90.5, 98.0)
Między badaczami	APA	402/422	95.3	(91.7, 98.1)
	ANA	398/418	95.2	(91.8, 98.1)
	OPA	400/420	95.2	(91.9, 98.1)
Między dniami	APA	1608/1688	95.3	(91.5, 98.2)
	ANA	1592/1672	95.2	(91.8, 98.2)
	OPA	1600/1680	95.2	(91.8, 98.2)

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percentylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen przypadków.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 równe 0 i 3+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, ponieważ nie kwalifikowały się do badania klinicznego dotyczącego raka sutka o niskim poziomie ekspresji HER2. Oceny HER2 równe 1+ i 2+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie, ponieważ kwalifikowały się lub potencjalnie kwalifikowały się do badania klinicznego.

Skuteczność analityczna — przypadki tkanek sutka HER2-dodatnie

Status zgodności między aparatami BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS — status HER2-dodatni

W badaniu zgodności wzięły udział trzy laboratoria w celu oceny równoważności skuteczności aparatów BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS. Na potrzeby analizy statusów HER2-dodatnich oceny HER2 IHC wynoszące 2+ lub 3+ definiowano

jako HER2-dodatnie, natomiast oceny wynoszące 0 lub 1+ definiowano jako HER2-ujemne. W przypadku analizy statystycznej statusów HER2-dodatnich 160 (80 dodatnich i 80 ujemnych przypadków, w tym 16 przypadków granicznych) przypadków zostało wstępnie wybranych do analizy przed odczytami patomorfologów. Preparaty tkankowe przygotowane ze wszystkich przypadków wybarwiono przy użyciu odczynnika do kontroli ujemnej i testu VENTANA HER2 (4B5) w wewnętrznym laboratorium firmy Roche. Zastosowano aparat BenchMark ULTRA i zalecany protokół barwienia. Niewybarwione preparaty tkankowe ze wszystkich przypadków zostały poddane randomizacji i podzielone na zestawy o takiej samej liczbie w celu wybarwienia w aparacie BenchMark ULTRA PLUS przy użyciu zalecanego protokołu barwienia VENTANA HER2 (4B5). W każdym z ośrodków jeden badacz, który nie znał statusów przypadków, ocenił preparaty wybarwione w aparacie BenchMark ULTRA PLUS i ustalił status białka HER2 (4B5). Wyniki zostały przeanalizowane przez firmę Roche. Podsumowanie wyników zawiera Tab 18.

Tab 18. Wartości zgodności statusów HER2-dodatnich, rozpatrywanych zbiorczo; dla przypadków wybarwionych przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5) w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny y = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik dodatni, badacz zewnętrzny y = wynik ujemny	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny y = wynik dodatni	Badacz Roche = wynik ujemny, badacz zewnętrzny y = wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	245	18	11	13	287
Wynik ujemny	6	13	5	327	351
Łącznie	251	31	16	340	638
Odsetek wyników dodatnich, % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	Nd.
	n/N			% (95-procentowy CI)	
PPA	(263/282)			93.3 (89.3, 96.6)	
NPA	(332/356)			93.3 (89.7, 96.5)	
OPA	(595/638)			93.3 (90.8, 95.6)	

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percentylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen IHC (0, 1+, 2+, 3+).

Uwaga: Podczas zbiorczej analizy zgodności uwzględniono wszystkie przypadki oraz wszystkie odczyty badaczy oceniających wyniki barwienia w aparacie ULTRA PLUS.

Uwaga: PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; OPA = procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem.

Badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej aparatu BenchMark ULTRA PLUS — status HER2-dodatni

Przeprowadzono badanie odtwarzalności międzylaboratoryjnej z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) w celu wykazania odtwarzalności testu wykonywanego w celu określenia statusu HER2-dodatniego w przypadkach raka sutka. W badaniu wykorzystano 28 archiwalnych próbek tkanek FFPE raka sutka, z których usunięto dane identyfikacyjne, a następnie barwiono w trzech aparatach BenchMark ULTRA PLUS każdego dnia w ciągu pięciu nienastępujących bezpośrednio po sobie dni w okresie 20 dni w trzech zewnętrznych laboratoriach. Próbkę reprezentowały zakres barwienia przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5).

Każdy zestaw 5 wybarwionych preparatów przypadający na próbkę oraz na dzień barwienia został poddany randomizacji i oceniony względem statusu HER2-dodatniego

przez łącznie 6 badaczy (2 badaczy na ośrodek). Wyniki dotyczące statusu HER2-dodatniego uzyskane dla próbek przez wszystkich badaczy, we wszystkich ośrodkach i dniach zostały połączone i przeanalizowane, a następnie porównane z wartościami modalnymi uzyskanymi przez badaczy dla tych samych próbek w celu określenia ogólnej odtwarzalności wyników dotyczących statusu HER2-dodatniego. Podsumowanie zgodności wyników wszystkich obserwacji możliwych do oceny pod kątem statusu HER2-dodatniego przy użyciu wartości modalnych uzyskanych przez badaczy na poziomie próbki jako odniesienia przedstawia Tab 19.

Tab 19. Odtwarzalność międzylaboratoryjna zgodności wszystkich wyników ogółem dla barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem statusu HER2-dodatniego.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Analiza pierwszorzędowa/ogółem	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Stratyfikacja według ośrodka	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Stratyfikacja według badacza	PPA	413/420	98.3	(96.9, 99.5)
	NPA	412/420	98.1	(95.8, 100.0)
	OPA	825/840	98.2	(96.9, 99.4)

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percytylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen przypadków.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 IHC równe 0 i 1+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, a oceny HER2 IHC równe 2+ i 3+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie.

Dodatkowo uzyskane statusy HER2 (4B5) porównywano parami między ośrodkami, badaczami i dniami. Zgodnie z danymi, które przedstawia Tab 20, wyniki testu były odtwarzalne w 5 dniach i 3 ośrodkach oraz wśród 6 badaczy.

Tab 20. Odtwarzalność międzylaboratoryjna zgodności wyników porównywanych parami dla barwienia tkanek raka sutka z użyciem testu VENTANA HER2 (4B5) wraz z oceną pod kątem statusu HER2-dodatniego.

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI
Między ośrodkami	APA	8074/8420	95.9	(92.8, 98.6)
	ANA	8034/8380	95.9	(92.5, 98.7)
	OPA	8054/8400	95.9	(92.7, 98.6)
Między badaczami	APA	402/421	95.5	(92.0, 98.6)
	ANA	400/419	95.5	(91.6, 98.6)
	OPA	401/420	95.5	(91.9, 98.6)
Między dniami	APA	1634/1684	97.0	(95.0, 98.9)
	ANA	1626/1676	97.0	(94.8, 98.9)
	OPA	1630/1680	97.0	(95.0, 98.9)

Odtwarzalność międzylaboratoryjna	Zgodność			
	Typ	n/N	%	95-procentowy CI

Uwaga: Dwustronne 95-procentowe CI obliczono przy użyciu metody percytylowej bootstrap, korzystając z 2000 powtórzeń wybranych ze stratyfikacją według grup kwalifikacyjnych ocen przypadków.

Uwaga: Na potrzeby analizy badawczej oceny HER2 IHC równe 0 i 1+ zgrupowano razem jako przypadki ujemne, a oceny HER2 IHC równe 2+ i 3+ zgrupowano razem jako przypadki dodatnie.

Charakterystyka wyników uzyskanych w aparacie BenchMark ULTRA przy użyciu zestawu iVIEW DAB Detection Kit lub *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Międzylaboratoryjna odtwarzalność barwienia i odtwarzalność pomiędzy dniami w aparacie BenchMark ULTRA: W badaniu odtwarzalności międzylaboratoryjnej wzięły udział trzy laboratoria z różnych instytucji na terenie Stanów Zjednoczonych. Preparaty ciętych skrawków tkanek FFPE z 48 przypadków inwazyjnego raka sutka [12 przypadków na każdą kategorię oceniania HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] i 1 parę preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides na każdy z 12 cykli barwienia dostarczono do ośrodków badawczych w celu wybarwienia w aparacie BenchMark ULTRA przy użyciu zalecanego protokołu barwienia i zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Jako kontroli używano preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides oraz drugiego preparatu z każdego przypadku wybarwionego odczynnikiem ujemnym pod względem immunoglobulin (Ig). Patomorfology, nieznający statusu przypadku, zbadali preparaty oraz przypisali każdemu z nich ocenę kliniczną (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Wyniki zostały przeanalizowane przez firmę Ventana. Używając standardowej nomenklatury dla tabel 2x2, średnią zgodność wyników dodatnich (APA) między ośrodkami obliczono ze wzoru $[2a/(2a+b+c)]$, a średnią zgodność wyników ujemnych (ANA) obliczono ze wzoru $[2d/(2d+b+c)]$. Gdy wzięto pod uwagę wszystkie ośrodki, wartość APA między ośrodkami obliczona na podstawie oceny klinicznej (dodatnia, ujemna) wynosiła 90.0% (108/120), a wartość ANA 92.9% (156/168). W przypadku porównania ośrodków parami wartość APA została obliczona ze wzoru $a/(a+c)$, a wartość ANA ze wzoru $d/(b+d)$. Wartości APA między ośrodkami wynosiły odpowiednio 93.0% (40/43), 87.2% (34/39) i 89.5% (34/38) dla następujących par: ośrodek A — ośrodek B, ośrodek A — ośrodek C i ośrodek B — ośrodek C. Wartości ANA między ośrodkami wynosiły odpowiednio 94.3% (50/53), 91.2% (52/57) i 93.1% (54/58) dla następujących par: ośrodek A — ośrodek B, ośrodek A — ośrodek C i ośrodek B — ośrodek C.

Poniższe tabele przedstawiają wyniki analizy 3x3 uzyskane dla każdego badacza. Analizę przeprowadzono, opierając się na ocenie klinicznej, w której oceny 2+ i 3+ były rozpatrywane oddzielnie.

Tab 21. Analiza 3x3 wartości zgodności międzylaboratoryjnej dla ośrodków A i B — przy użyciu klonu 4B5 z zestawem *ultraView* Universal DAB Detection Kit w aparacie BenchMark ULTRA.

Ośrodek A	Ośrodek B			
	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Łącznie	12	9	27	48
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA): n/N (%) (95-procentowy CI) 43/48 (89.6) (77.8–95.5)				

Tab 22. Analiza 3x3 wartości zgodności międzylaboratoryjnej dla ośrodków A i C — przy użyciu klonu 4B5 z zestawem *ultraView* Universal DAB Detection Kit w aparacie BenchMark ULTRA.

Ośrodek A	Ośrodek C			
	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	12	1	1	14

	Ośrodek C			
Ośrodek A	3+	2+	0, 1+	Łącznie
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Łącznie	12	5	31	48
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA): n/N (%) (95-procentowy CI) 42/48 (87.5) (75.3–94.1)				

Tab 23. Analiza 3x3 wartości zgodności międzylaboratoryjnej dla ośrodków B i C — przy użyciu klonu 4B5 z zestawem *ultraView* Universal DAB Detection Kit w aparacie BenchMark ULTRA.

	Ośrodek C			
Ośrodek B	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Łącznie	12	5	31	48
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (OPA): n/N (%) (95-procentowy CI) 44/48 (91.7) (80.4–96.7)				

Odtwarzalność barwienia między dniami w aparacie BenchMark ULTRA

Część badania dotycząca odtwarzalności między dniami (IDR) obejmowała 12 przypadków, wśród których po około trzy (3) przypadki miały przypadać na każdą ocenę kliniczną (0, 1+, 2+, 3+). W sumie w ramach części badania dotyczącej odtwarzalności między dniami (IDR) przeprowadzono 5 cykli barwienia w aparacie BenchMark ULTRA w jednym ośrodku (ośrodek C) w następujących po sobie dniach w ciągu minimum 20 dni. Wartości APA i ANA uzyskane w części badania dotyczącej IDR i obliczone na podstawie oceny klinicznej barwienia klonem 4B5 w ośrodku C we wszystkich dniach wynosiły po 100%. Wartość procentowej zgodności wszystkich wyników ogółem (OPA) dla porównań między dniami obliczona na podstawie ocen klinicznych wynosiła 100% dla każdego porównania między dniami oraz dla wszystkich dni łącznie.

Badanie porównywania aparatów BenchMark ULTRA i BenchMark XT

W badaniu porównywania platform wzięły udział dwa laboratoria wykonujące barwienia i trzy ośrodki dokonujące odczytów znajdujące się na terenie Stanów Zjednoczonych. Preparaty ciętych skrawków tkanek FFPE z 280 przypadków inwazyjnego raka sutka [około 70 przypadków z każdej kategorii oceniania HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] dostarczono losowo do dwóch ośrodków wykonujących barwienia (140 przypadków na ośrodek) w celu wybarwienia w aparatach BenchMark XT i BenchMark ULTRA przy użyciu odpowiednich zalecanych protokołów barwienia i zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Jako kontroli używano preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides oraz drugiego preparatu z każdego przypadku wybarwionego odczynikiem ujemnym pod względem immunoglobulin (Ig). Wybarwione przypadki z ośrodka 1 i ośrodka 2 rozdzielono na cztery zestawy preparatów, a następnie każdy zestaw pojedynczo dostarczono do trzech różnych wykwalifikowanych badaczy (patomorfologów); jednego badacza w ośrodku 1, jednego w ośrodku 2 i jednego w ośrodku 3. Patomorfolodzy, nieznający statusu przypadku oraz platformy wykorzystanej do barwienia, zbadali wszystkie cztery zestawy preparatów, a następnie każdemu przypadkowi przypisali ocenę kliniczną (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Wyniki zostały przeanalizowane przez firmę Ventana. Wartości PPA (i dolna granica dwustronnych 95-procentowych przedziałów ufności) dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 przeciwiała w porównywanych aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT obliczone na podstawie porównania ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) wynosiły odpowiednio 91.6% (85.9), 91.2% (85.3) i 94.9% (89.3) dla badaczy A, B i C. Wartości NPA (i dolna granica dwustronnych 95-procentowych przedziałów ufności) dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 przeciwiała w porównywanych aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT obliczone na podstawie porównania ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) wynosiły odpowiednio 91.9% (85.8), 93.8% (88.3) i 99.3% (96.3) dla badaczy A, B i C. Wartości OPA dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 w porównywanych aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT obliczone na podstawie analizy 2x2 ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) wynosiły odpowiednio 91.8%, 92.5% i 97.4% dla badaczy A, B i C. Prezentację

3x3 wartości zgodności między platformami dla każdego badacza obliczonych na podstawie oceny klinicznej (0/1+, 2+, 3+) przedstawiają tabele poniżej.

Tab 24. Analiza 3x3 wartości zgodności między platformami w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT — badacz A.

Aparat BenchMark ULTRA	Aparat BenchMark XT			
Badacz A	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Łącznie	96	47	124	267
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI) 226/267 (84.6) (79.8–88.5)				

Tab 25. Analiza 3x3 wartości zgodności między platformami w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT — badacz B.

Aparat BenchMark ULTRA	Aparat BenchMark XT			
Badacz B	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Łącznie	69	68	130	267
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI) 242/267 (90.6) (86.5–93.6)				

Tab 26. Analiza 3x3 wartości zgodności między platformami w aparatach BenchMark ULTRA i BenchMark XT — badacz C.

Aparat BenchMark ULTRA	Aparat BenchMark XT			
Badacz C	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Łącznie	66	52	149	267
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI) 257/267 (96.3) (93.2–98.0)				

Odtwarzalność wyników między patomorfologami oceniającymi preparaty z badania porównywania aparatów

Wartości zgodności wyników dodatnich i ujemnych z dwustronnymi 95-procentowymi przedziałami ufności obliczono dla sześciu możliwych porównań parami pomiędzy badaczami dla każdej platformy.

Dla aparatu BenchMark ULTRA wartości PPA wynosiły odpowiednio 94.7% (126/133), 98.2% (111/113), 98.2% (111/113), 89.4% (126/141), 78.7% (111/141) i 83.5% (111/133) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartości NPA wynosiły odpowiednio 88.8% (119/134), 80.5% (124/154), 85.7% (132/154), 94.4% (119/126), 98.4% (124/126) i 98.5% (132/134) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartość OPA była najwyższa między badaczem A i badaczem B (91.8%), a niższa między badaczem B i badaczem C (91.0%) oraz między badaczem A i badaczem C (88.8%).

Dla aparatu BenchMark XT wartości PPA wynosiły odpowiednio 94.9% (130/137), 98.3% (116/118), 98.3% (116/118), 90.9% (130/143), 81.1% (116/143) i 84.7% (116/137) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartości NPA wynosiły odpowiednio 90.0% (117/130), 81.9% (122/149), 85.9% (128/149), 94.4% (117/124), 98.4% (122/124) i 98.5% (128/130) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartość OPA była najwyższa między badaczem

A i badaczem B (92.5%), a niższa między badaczem B i badaczem C (91.4%) oraz między badaczem A i badaczem C (89.1%).

Badanie porównywania zestawów *VIEW DAB Detection Kit* i *ultraView Universal DAB Detection Kit*

Kohorta 140 tkanek FFPE z przypadków inwazyjnego raka sutka z ośrodka 1 [około 35 przypadków z każdej kategorii oceniania HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] została wykorzystana w badaniu porównywania działania zestawów *VIEW DAB Detection Kit* i *ultraView Universal DAB Detection Kit* podczas barwienia przy użyciu klonu 4B5 w aparacie BenchMark ULTRA. W badaniu porównywania detekcji wzięły udział jedno laboratorium wykonujące barwienia i trzy ośrodki dokonujące odczytów znajdujące się na terenie Stanów Zjednoczonych. Wartości PPA między wynikami uzyskanymi przy użyciu zestawów *VIEW DAB Detection Kit* i *ultraView Universal DAB Detection Kit* podczas barwienia klonem 4B5 przeciwciała w aparacie BenchMark ULTRA obliczone na podstawie oceny klinicznej (dodatnia, ujemna) wynosiły odpowiednio 95.8% (68/71), 96.9% (63/65) i 96.5% (55/57) dla badaczy A, B i C, a wartości NPA pomiędzy metodami detekcji wynosiły odpowiednio 90.8% (59/65), 91.5% (65/71) i 97.5% (77/79) dla badaczy A, B i C. Wartości OPA między wynikami uzyskanymi przy użyciu zestawów detekcyjnych wynosiły odpowiednio 93.4% (127/136), 94.1% (128/136) i 97.1% (132/136) dla badaczy A, B i C. Prezentację 3x3 wartości zgodności porównań detekcji dla każdego badacza obliczonych na podstawie oceny klinicznej (0/1+, 2+, 3+) przedstawiają tabele poniżej.

Tab 27. Analiza 3x3 wartości zgodności między zestawem *VIEW DAB Detection Kit* a zestawem *ultraView Universal DAB Detection Kit* dla badacza A — barwienie przy użyciu klonu 4B5 w aparacie BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Badacz A	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Łącznie	46	25	65	136
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI)				
119/136 (87.5) (80.9–92.0)				

Tab 28. Analiza 3x3 wartości zgodności między zestawem *VIEW DAB Detection Kit* a zestawem *ultraView Universal DAB Detection Kit* dla badacza B — barwienie przy użyciu klonu 4B5 w aparacie BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Badacz B	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Łącznie	33	32	71	136
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI)				
128/136 (94.1) (88.8–97.0)				

Tab 29. Analiza 3x3 wartości zgodności między zestawem *VIEW DAB Detection Kit* a zestawem *ultraView Universal DAB Detection Kit* dla badacza C — barwienie przy użyciu klonu 4B5 w aparacie BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Badacz C	3+	2+	0, 1+	Łącznie
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Łącznie	32	25	79	136

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Badacz C	3+	2+	0, 1+	Łącznie
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem: n/N (%) (95-procentowy CI)				
132/136 (97.1) (92.7–98.9)				

Odtwarzalność wyników między patomorfologami oceniającymi preparaty z badania porównywania detekcji:

Wartości zgodności wyników dodatnich i ujemnych z dwustronnymi 95-procentowymi przedziałami ufności obliczono dla sześciu możliwych porównań parami pomiędzy badaczami dla każdej metody.

Dla zestawu *VIEW DAB Detection Kit* wartości PPA wynosiły odpowiednio 100.0% (69/69), 98.2% (56/57), 96.5% (55/57), 93.2% (69/74), 75.7% (56/74) i 79.7% (55/69) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartości NPA wynosiły odpowiednio 92.5% (62/67), 77.2% (61/79), 82.3% (65/79), 100.0% (62/62), 98.4% (61/62) i 97.0% (65/67) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartość procentowej zgodności wszystkich wyników ogółem była najwyższa między badaczem A i badaczem B (96.3%), a niższa między badaczem A i badaczem C (86.0%) oraz między badaczem B i badaczem C (88.2%).

Dla zestawu *ultraView Universal DAB Detection Kit* wartości PPA wynosiły odpowiednio 96.9% (63/65), 98.2% (56/57), 98.2% (56/57), 88.7% (63/71), 78.9% (56/71) i 86.2% (56/65) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartości NPA wynosiły odpowiednio 88.7% (63/71), 81.0% (64/79), 88.6% (70/79), 96.9% (63/65), 98.5% (64/65) i 98.6% (70/71) dla następujących par badaczy: A — B; A — C; B — C; B — A; C — A oraz C — B. Wartości procentowej zgodności wszystkich wyników ogółem były podobne dla wszystkich par badaczy i wynosiły odpowiednio 92.6% (126/136), 88.2% (120/136) i 92.6% (126/136) dla następujących par: badacz A — B, badacz A — C i badacz B — C.

Skuteczność analityczna — przypadki raka żołądka

Badania precyzji aparatów BenchMark ULTRA i BenchMark XT:

Powtarzalność między cyklami barwienia wykonywanymi w aparacie BenchMark XT została określona na podstawie pięciu cykli barwienia wykonywanych przez 5 (nienastępujących bezpośrednio po sobie) dni. Pięć preparatów wykonanych z trzech przypadków tkanek raka żołądka o ekspresji białka HER2 ocenionej na 0, 1+, 2+ i 3+ wykazywało 100-procentową zgodność z wartością dodatnią/ujemną przypisaną każdej z tych tkanek.

Powtarzalność w ramach cyklu barwienia w aparacie BenchMark XT została określona poprzez wybarwienie 28 preparatów wykonanych z trzech przypadków tkanek żołądka o ekspresji białka HER2 ocenionej na 0, 1+, 2+ i 3+. Dla wszystkich przypadków uzyskano oceny zgodne z dodatnią/ujemną wartością przypisaną poszczególnym typom tkanek.

Powtarzalność w ramach platformy została określona przy użyciu trzech aparatów BenchMark XT. Dla wszystkich 30 preparatów wykonanych z dwóch bloczków wielotkankowych składających się z trzech przypadków tkanek żołądka o ekspresji białka HER2 ocenionej na 0, 1+, 2+ i 3+ uzyskano oceny zgodne z dodatnią/ujemną wartością przypisaną każdemu z tych typów tkanek.

Powtarzalność w ramach platformy została zbadana przy użyciu trzech aparatów BenchMark ULTRA. Dla wszystkich 15 preparatów wykonanych z jednego bloczka wielotkankowego uzyskano oceny zgodne z dodatnią/ujemną wartością przypisaną poszczególnym typom tkanek.

Powtarzalność między platformami została zbadana przy użyciu trzech aparatów BenchMark XT i trzech aparatów BenchMark ULTRA. Dla wszystkich 30 preparatów wykonanych z jednego bloczka wielotkankowego uzyskano oceny zgodne z dodatnią/ujemną wartością przypisaną poszczególnym typom tkanek.

Porównanie zestawów detekcyjnych *VIEW DAB Detection Kit* i *ultraView Universal DAB Detection Kit* z wykorzystaniem tkanek żołądka

Klon 4B5 wykorzystano do przeprowadzenia badania porównania zestawów detekcyjnych w dwóch aparatach (aparaty BenchMark XT i BenchMark ULTRA) przy użyciu zestawów detekcyjnych *VIEW DAB Detection Kit* i *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Do badań wykorzystano dwieście przypadków tkanek. Wybarwione preparaty zostały ocenione pod kątem dodatniej/ujemnej oceny klinicznej.

Wskaźniki akceptowalności morfologii i tła wynosiły 100% dla obu zestawów detekcyjnych i obu aparatów. Poniższe tabele zawierają wyniki bezpośrednich porównań ocen dodatnich i ujemnych między zestawami detekcyjnymi przeprowadzanych dla poszczególnych aparatów.

Tab 30. Zgodność ocen klinicznych określonych przy użyciu zestawów *ultraView* Universal DAB Detection Kit i *VIEW* DAB Detection Kit stosowanych w aparacie BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	21	0	21
Wynik ujemny	0	189	189
Łącznie	21	189	210
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	21/21	100 (84.5–100)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	189/189	100 (98.0–100)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	210/210	100 (98.2–100)	

Tab 31. Porównanie ocen klinicznych określonych przy użyciu zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit między aparatami BenchMark XT i BenchMark ULTRA.

Zestaw <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit stosowany w aparacie BenchMark XT	Zestaw <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit stosowany w aparacie BenchMark ULTRA		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	20	1	21
Wynik ujemny	0	189	189
Łącznie	20	190	210
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	20/20	100 (83.9–100)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	189/190	99.5 (97.1–99.9)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	209/210	99.5 (97.4–99.9)	

Międzylaboratoryjna odtwarzalność barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu klonu 4B5:

Badanie zostało przeprowadzone w trzech ośrodkach badawczych. Próbkę zostały włączone do badania na podstawie klinicznej oceny barwienia IHC przy użyciu klonu 4B5. Próbkę wybierano w taki sposób, aby liczba przypadków dodatnich (3+) i ujemnych (0, 1+) była mniej więcej równa. Dodatkowo zbadano do czterech kwalifikujących się do badania przypadków raka żołądka o ocenie 2+.

W każdym z trzech ośrodków przeprowadzono po cztery cykle barwienia w aparatach BenchMark XT i BenchMark ULTRA. Przypadki przeznaczone do wybarwienia zostały poddane randomizacji stratyfikowanej w taki sposób, aby w każdym cyklu barwienia uwzględnić przypadki reprezentujące wszystkie kategorie oceny ekspresji białka HER2 w tkankach raka żołądka. Podczas cykli barwienia w poszczególnych aparatach, w poszczególnych ośrodkach uwzględniano te same przypadki. W każdym z ośrodków dla każdego przypadku barwiono po jednym preparacie przy użyciu klonu 4B5 i po jednym preparacie przy użyciu odczynnika CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Wszystkie preparaty barwiono w aparacie BenchMark ULTRA. Druga para preparatów z tego samego przypadku była barwiona w taki sam sposób w aparacie BenchMark XT w każdym ośrodku. W każdym z ośrodków jeden wykwalifikowany badacz ocenił wybarwienie preparatów, nie znając ocen klinicznych, które zostały im przypisane wcześniej za pomocą metody IHC.

Zgodność wszystkich wyników ogółem uzyskanych dla wszystkich możliwych do oceny przypadków wyniosła 100% dla porównań między wszystkimi trzema ośrodkami zarówno w przypadku aparatu BenchMark ULTRA, jak i aparatu BenchMark XT. Zgodność wszystkich wyników ogółem uzyskanych dla możliwych do oceny przypadków między aparatami BenchMark ULTRA i BenchMark XT wyniosła 100% dla wszystkich trzech ośrodków. Wskaźniki akceptowalności morfologii oraz tła wynosiły 100% dla obu aparatów w ośrodkach A i C oraz > 95% dla obu aparatów w ośrodku B. Więcej informacji zawierają tabele poniżej.

Tab 32. Zgodność wszystkich ocen klinicznych ogółem — między ośrodkami, rak żołądka, wszystkie przypadki możliwe do oceny.

Aparat BenchMark ULTRA	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (przypadki dodatnie i ujemne)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (w tym przypadki niejednoznaczne)
Ośrodek A i ośrodek B: n/N (%) (95-procentowy CI)	30/30 (100%) (88.6–100)	38/42 (90.5%) (77.9–96.2)
Ośrodek A i ośrodek C: n/N (%) (95-procentowy CI)	30/30 (100%) (88.6–100)	35/42 (83.3%) (69.4–91.7)
Ośrodek B i ośrodek C: n/N (%) (95-procentowy CI)	30/30 (100%) (88.6–100)	31/42 (73.8%) (58.9–84.7)
Aparat BenchMark XT	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (przypadki dodatnie i ujemne)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (w tym przypadki niejednoznaczne)
Ośrodek A i ośrodek B: n/N (%) (95-procentowy CI)	31/31 (100%) (89.0–100.0)	36/43 (83.7%) (70.0–91.9)
Ośrodek A i ośrodek C: n/N (%) (95-procentowy CI)	31/31 (100%) (89.0–100.0)	36/43 (83.7%) (70.0–91.9)
Ośrodek B i ośrodek C: n/N (%) (95-procentowy CI)	31/31 (100%) (89.0–100.0)	35/43 (81.4%) (67.4–90.3)

Tab 33. Zgodność wszystkich ocen klinicznych ogółem — między platformami, rak żołądka, wszystkie przypadki możliwe do oceny.

Aparat BenchMark ULTRA i aparat BenchMark XT	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (przypadki dodatnie i ujemne)	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (w tym przypadki niejednoznaczne)
Ośrodek A: n/N (%) (95-procentowy CI)	40/40 (100%) (91.2–100)	42/44 (95.5%) (84.9–98.7)
Ośrodek B: n/N (%) (95-procentowy CI)	34/34 (100%) (89.8–100)	37/42 (88.1%) (75.0–94.8)
Ośrodek C: n/N (%) (95-procentowy CI)	32/32 (100%) (89.3–100)	38/44 (86.4%) (73.3–93.6)

Tab 34. Współczynniki akceptowalności barwienia tła i morfologii: wszystkie przypadki raka żołądka.

Aparat BenchMark ULTRA	Ośrodek A	Ośrodek B	Ośrodek C
Współczynniki akceptowalności morfologii	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Współczynniki akceptowalności tła	44/44 (100%)	42/44 (95.5%)	44/44 (100%)

Aparat BenchMark ULTRA	Ośrodek A	Ośrodek B	Ośrodek C
Aparat BenchMark XT	Ośrodek A	Ośrodek B	Ośrodek C
Współczynniki akceptowalności morfologii	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Współczynniki akceptowalności tła	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)

Badanie porównywania aparatów BenchMark i BenchMark GX z aparatem BenchMark XT: rak żołądka

Preparaty ciętych skrawków z 3 mikromacierzy TMA zawierających przypadki tkanek FFPE raka żołądka [około 50 przypadków na TMA] zostały wybarwione w aparatach BenchMark XT, BenchMark i BenchMark GX przy użyciu zalecanych protokołów barwienia dla zestawów *ultraView* Universal DAB Detection Kit i *iVIEW* DAB Detection Kit. Jako kontroli używano preparatów PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides oraz drugiego preparatu z każdej z mikromacierzy TMA wybarwionego odczynnikiem ujemnym pod względem immunoglobulin (Ig). Wybarwione preparaty zostały ocenione przez jednego badacza (patomorfologa).

Wartości zgodności wszystkich wyników ogółem (i dolna granica dwustronnych 95-procentowych przedziałów ufności) dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 przeciwciała obliczone na podstawie porównania ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) były następujące: 98.0% (94.2–99.3) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 97.4% (93.6–99.0) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 96.6% (92.7–98.4) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit; oraz 95.9% (91.8–98.0) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit.

Wartości zgodności wyników dodatnich (i dolna granica dwustronnych 95-procentowych przedziałów ufności) dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 przeciwciała obliczone na podstawie porównania ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) były następujące: 91.7% (64.4–98.5) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 78.6% (52.4–92.4) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 80.0% (54.8–93.0) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit; oraz 73.3% (48.0–89.1) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit.

Wartości zgodności wyników ujemnych (i dolna granica dwustronnych 95-procentowych przedziałów ufności) dla barwienia przy użyciu klonu 4B5 obliczone na podstawie porównania ocen klinicznych (dodatnich i ujemnych) były następujące: 98.5% (94.8–99.6) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 99.3% (96.1–99.9) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *ultraView* Universal DAB Detection Kit; 98.1% (94.6–99.4) w przypadku aparatów BenchMark i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit; oraz 98.1% (94.5–99.3) w przypadku aparatów BenchMark GX i BenchMark XT, w których zastosowano zestaw *iVIEW* DAB Detection Kit. Prezentację 2x2 wartości zgodności poszczególnych porównań opartych na ocenach klinicznych (dodatnich i ujemnych) przedstawiają tabele poniżej.

Tab 35. Analiza 2x2 wartości zgodności wyników między platformami dla aparatów BenchMark i BenchMark XT podczas wykonywania barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Klon 4B5 stosowany razem z zestawem <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Aparat BenchMark	Aparat BenchMark XT		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	11	2	13
Wynik ujemny	1	133	134
Łącznie	12	135	147

Klon 4B5 stosowany razem z zestawem <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Aparat BenchMark	Aparat BenchMark XT		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	144/147	98.0% (94.2–99.3)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	11/12	91.7% (64.6–98.5)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	133/135	98.5% (94.8–99.6)	

Tab 36. Analiza 2x2 wartości zgodności wyników między platformami dla aparatów BenchMark GX i BenchMark XT podczas wykonywania barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu zestawu *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Klon 4B5 stosowany razem z zestawem <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Aparat BenchMark GX	Aparat BenchMark XT		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	11	1	12
Wynik ujemny	3	140	143
Łącznie	14	141	155
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	151/155	97.4% (93.6–99.0)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	11/14	78.6% (52.4–92.4)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	140/141	99.3% (96.1–99.9)	

Tab 37. Analiza 2x2 wartości zgodności wyników między platformami dla aparatów BenchMark i BenchMark XT podczas wykonywania barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu zestawu *iVIEW* DAB Detection Kit.

Klon 4B5 stosowany razem z zestawem <i>iVIEW</i> DAB Detection Kit			
Aparat BenchMark	Aparat BenchMark XT		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	12	3	15
Wynik ujemny	3	156	159
Łącznie	15	159	174
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	168/174	96.6% (92.7–98.4)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	12/15	80.0% (54.8–93.0)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	156/159	98.1% (94.6–99.4)	

Tab 38. Analiza 2x2 wartości zgodności wyników między platformami dla aparatów BenchMark GX i BenchMark XT podczas wykonywania barwienia tkanek raka żołądka przy użyciu zestawu iVIEW DAB Detection Kit.

Klon 4B5 stosowany razem z zestawem iVIEW DAB Detection Kit			
Aparat BenchMark GX	Aparat BenchMark XT		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	11	3	14
Wynik ujemny	4	154	158
Łącznie	15	157	172
	n/N	% (95-procentowy CI)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	165/172	95.9% (91.8–98.0)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	11/15	73.3% (48.0–89.1)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	154/157	98.1% (94.5–99.3)	

SKUTECZNOŚĆ KLINICZNA

Niski poziom ekspresji HER2 w przypadku raka sutka

Badanie rezultatu klinicznego — DESTINY-BREAST04

Badanie DESTINY-BREAST04 było wieloośrodkowym, randomizowanym, otwartym badaniem III fazy prowadzonym z grupą kontrolną otrzymującą aktywne leczenie, którego celem była ocena bezpieczeństwa i skuteczności stosowania trastuzumabu derukstekanu (ENHERTU®) u osób z nieoperacyjnym i/lub przerzutowym rakiem sutka z niskim poziomem ekspresji białka HER2.

Aby kwalifikować się do włączenia do badania, guzy musiały wykazywać niski poziom ekspresji białka HER2 określany metodą IHC przy użyciu przeciwciała anti-HER2 (4B5). Guz o ocenie HER2 IHC wynoszącej 1+ był uznawany za guz z niską ekspresją białka HER2. Guz był również uznawany za guz z niską ekspresją białka HER2, jeśli ocena HER2 IHC była równa 2+, a wynik testu dodatkowego, polegającego na przeprowadzeniu testu INFORM HER2 Dual ISH, wskazywał brak amplifikacji genu HER2 (ISH-). Pacjentów włączonych do badania przydzielono poprzez randomizację w stosunku 2:1 do grupy przyjmującej trastuzumab derukstekan (ENHERTU®) albo grupy poddawanej chemioterapii dobranej przez lekarza. Uzyskana w laboratorium centralnym ocena HER2 wskazująca na niską ekspresję (IHC 1+ lub IHC 2+/ISH-) była jednym z 3 czynników stratyfikacji wykorzystywanych do randomizacji pacjentów na potrzeby tego badania.

Analizy skuteczności przeprowadzono na pełnym zestawie analitycznym i populacji dodatniej względem receptora hormonalnego (dodatni wynik badania pod kątem obecności receptora estrogenowego i/lub receptora progesteronowego).

W ramach analizy pierwszorzędowej analizowano przeżycie bez progresji choroby (PFS) określone na podstawie niezależnej analizy centralnej przeprowadzanej w warunkach zaślepienia (BICR) w podgrupie dodatniej względem receptora hormonalnego ze stratyfikacją według ocenionych w laboratorium centralnym statusów/ocen wskazujących na niski poziom ekspresji HER2 (IHC 1+ lub IHC 2+/ISH-), liczby wcześniejszych linii leczenia inhibitorami kinaz zależnych od cyklin (CDK)4/6 (wcześniejsze leczenie lub brak wcześniejszego leczenia). Leczenie trastuzumabem derukstekanem (ENHERTU®) było powiązane ze statystycznie istotnym i klinicznie znaczącym wzrostem wartości PFS, a także wzrostem wartości przeżycia całkowitego (OS) w tej populacji w porównaniu z leczeniem wybranym przez lekarza.

Tab 39. Wartości PFS i OS wg BIRC w populacji dodatniej względem receptora hormonalnego oraz pełnym zestawie analitycznym (DESTINY-BREAST04)

Parametr	Populacja dodatnia względem receptora hormonalnego		Pełen zestaw analityczny	
	Trastuzumab derukstekan (ENHERTU®) N = 331	Leczenie dobrane przez lekarza N = 163	Trastuzumab derukstekan (ENHERTU®) N = 373	Leczenie dobrane przez lekarza N = 184
Mediana wartości PFS ^a (95-procentowy CI)	10.1 (9.5, 11.5)	5.4 (4.4, 7.1)	9.9 (9.0, 11.3)	5.1 (4.2, 6.8)
Współczynnik ryzyka ^b (95-procentowy CI)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	
Wartość p ^c	< 0.0001		< 0.0001	
Przeżycie całkowite (OS)				
Mediana OS ^a (95-procentowy CI)	23.9 (20.8, 24.8)	17.5 (15.2, 22.4)	23.4 (20.0, 24.8)	16.8 (14.5, 20.0)
Współczynnik ryzyka ^b (95-procentowy CI)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
Wartość p ^c	0.0028		0.0010	

CI = przedział ufności, PFS = przeżycie bez progresji choroby, OS = przeżycie całkowite

^a Mediana PFS i mediana OS są wartościami oszacowanymi na podstawie analizy Kaplana-Meiera. Dwustronne 95-procentowe przedziały ufności dla mediany wartości PFS i mediany wartości OS obliczono przy użyciu metody Brookmeyer-Crowleya.

^b Na podstawie modelu proporcjonalnego hazardu Coxa ze stratyfikacją. Stratyfikację przeprowadzono w oparciu o następujące czynniki: ocena wskazująca na niski poziom ekspresji HER2, liczba wcześniejszych linii leczenia chemioterapeutycznego oraz informacja dotycząca wcześniejszego leczenia inhibitorami kinaz zależnych od cyklin 4/6 (w przypadku pełnego zestawu analitycznego i populacji dodatniej względem receptora hormonalnego) lub status receptora hormonalnego/kinaz zależnych od cyklin (w przypadku pełnego zestawu analitycznego).

^c Dwustronna wartość p oparta na stratyfikowanym logarytmicznym teście rang.

HER2-dodatni rak sutka

Badania porównania skuteczności klonu 4B5 króliczego przeciwciała monoklonalnego z przeciwciałem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody w przypadku raka sutka

Przeprowadzono badanie porównania metod mające na celu zbadanie korelacji wyników uzyskanych przy użyciu klonu 4B5 z wynikami uzyskanymi przy użyciu dwóch zatwierdzonych testów diagnostycznych: testu wykorzystującego przeciwciało PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (przeciwciało PATHWAY anti-HER2 (CB11)) oraz testu PathVysion HER2 FISH. W badaniu wzięło udział sześciu badaczy. W badaniu uwzględniono dwie niezależne kohorty próbek inwazyjnego raka sutka: jedna z nich obejmowała 178 próbek uzyskanych z placówki Cleveland Clinic Foundation (kohorta 1), a druga obejmowała 144 próbki pobrane przez firmę IMPATH Predictive Oncology z wielu międzynarodowych ośrodków (kohorta 2). Dwie grupy, każda złożona z trzech różnych badaczy, oceniły dwie niezależne kohorty (kohorta 1: n = 178, kohorta 2: n = 144). Ocenie poddawano przypadki raka sutka o znanej charakterystyce barwienia przy użyciu przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11) i klonu 4B5. Z wywiadu klinicznego pacjenta uzyskano dane dotyczące metody FISH. Dla każdego przypadku wybarwionego każdym przeciwciałem, na podstawie oceny trzech badaczy, utworzono jedną uzgodnioną ocenę w celu zredukowania zmienności oceny dokonywanej przez jednego badacza, która występowała podczas oceny białka HER2.^{42,43,44} Łącznie oceniono 322 przypadki. Preparaty wybarwione przy użyciu przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11) zostały poddane obróbce i wybarwione zgodnie z instrukcjami producenta zawartymi w

arkusza metody przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11). Przerwa pomiędzy wybarwieniem a odczytem preparatów wybarwionych przy użyciu przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11) wynosiła średnio około rok. Poniżej przedstawiono klinicznie istotne wyniki (dodatnie/ujemne) uzyskane za pomocą testu IHC HER2 (4B5) i testu IHC PATHWAY anti-HER2 (CB11) w dwóch kohortach:

Tab 40. Oceny istotne klinicznie: testy IHC wykonywane w kohorcie 1

Przeciwciało HER2 (4B5)	Przeciwciało PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	86	5	91
Wynik ujemny	7	80	87
Łącznie	93	85	178
	n/N	% (95-procentowy przedział ufności)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	86/93	92.5 (85.2–96.9)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	80/85	94.1 (86.8–98.1)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	166/178	93.3 (88.5–96.4)	
Za klinicznie istotne wyniki uznawane były dodatnie (2+ i 3+) i ujemne (0+ i 1+) wyniki testu IHC			

Tab 41. Oceny istotne klinicznie: testy IHC wykonywane w kohorcie 2

Przeciwciało HER2 (4B5)	Przeciwciało PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
Wynik dodatni	69	22	91
Wynik ujemny	0	53	53
Łącznie	69	75	144
	n/N	% (95-procentowy przedział ufności)	
Procentowa zgodność wyników dodatnich	69/69	100 (97.5–100)	
Procentowa zgodność wyników ujemnych	53/75	70.6 (58.5–80.1)	
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	122/144	84.7 (78.2–90.0)	
Za klinicznie istotne wyniki uznawane były dodatnie (2+ i 3+) i ujemne (0+ i 1+) wyniki testu IHC			

Wyniki testu IHC HER2 (4B5) wykonywanego metodą IHC porównano również z wynikami testu PathVysion HER2 FISH. Dodatnie wyniki testu IHC odnosiły się do przypadków z oceną IHC równą 2+ lub 3+, a dodatnie wyniki testu FISH odnosiły się do przypadków, w których wykryto amplifikację genu HER2. Dane dotyczące zgodności wyników testu IHC z użyciem klonu 4B5 w porównaniu z wynikami testu FISH dla dwóch kohort przedstawiono poniżej:

Tab 42. Zgodność istotna klinicznie: porównanie wyników testu IHC i testu FISH wykonywanych w kohorcie 1

Przeciwciała HER2 (4B5)	n/N	% (95-procentowy przedział ufności)
Procentowa zgodność wyników dodatnich	83/93	89.2 (82.5–95.1)
Procentowa zgodność wyników ujemnych	77/85	90.6 (84.0–96.4)
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	160/178	90.0 (85.4–93.6)

Tab 43. Zgodność istotna klinicznie: porównanie wyników testu IHC i testu FISH wykonywanych w kohorcie 2

Przeciwciała HER2 (4B5)	n/N	% (95-procentowy przedział ufności)
Procentowa zgodność wyników dodatnich	80/86	93.0 (87.9–96.3)
Procentowa zgodność wyników ujemnych	47/58	81.0 (73.4–86.0)
Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem	127/144	88.2 (82.1–92.2)

Wniosek: W badaniu wykazano, że istnieje istotna zgodność (zgodność wszystkich wyników dodatnich i ujemnych rozpatrywanych ogółem) między testem wykorzystującym klon 4B5 a testem wykorzystującym przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11), co wskazuje, że test VENTANA HER2 (4B5) jest dopuszczalną alternatywą dla testu wykorzystującego przeciwciała PATHWAY anti-HER2 (CB11) w celu wspomagania oceny pacjentów z rakiem sutka, w przypadku których rozważa się zastosowanie terapii trastuzumabem (Herceptin). W badaniu również wykazano, że wyniki dotyczące ekspresji białka HER2 uzyskane za pomocą barwienia IHC przy użyciu testu wykorzystującego klon 4B5 są porównywalne do wyników dotyczących statusu genu HER2 uzyskanych przy użyciu analizy metodą FISH.

Porównanie z testem kwalifikującym do badań preparatów PERJETA (pertuzumab) i KADCYLA (trastuzumab emtanzyna) w przypadku raka sutka

Zgodność z testami kwalifikującymi do poszczególnych kohort w badaniach preparatów PERJETA i KADCYLA została określona poprzez wybarwienie próbek z badań klinicznych przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5). 2753 próbki ocenione na potrzeby badania klinicznego preparatu PERJETA i 99 próbek ocenionych na potrzeby badania klinicznego preparatu KADCYLA wybarwiono przy użyciu testu VENTANA HER2 (4B5). Określono wartości zgodności (PPA, NPA i OPA). 95-procentowy CI (dwustronny 95-procentowy przedział ufności) obliczono przy użyciu metody oceny.

Tab 44. Wartości zgodności klonu 4B5 i testów firmy Dako w kontekście określania statusu HER2 dla wszystkich preparatów możliwych do oceny pod kątem statusu HER2. Możliwe do oceny preparaty wybarwione metodą IHC miały status HER2 dodatni lub ujemny określony na podstawie barwienia przy użyciu klonu 4B5 oraz testu IHC kwalifikującego do badania klinicznego.

Badanie	Ocena barwienia klonem 4B5 ^b	Status HER2 wg testu Dako ^{a,b}		
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
PERJETA i KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Łącznie	2558	272	2830
	Procentowa zgodność wyników dodatnich n/N (%) (95-procentowy CI)	2380/2558 (93.0) (92.0–94.0)		

Badanie	Ocena barwienia klonem 4B5 ^b	Status HER2 wg testu Dako ^{a,b}		
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
	Procentowa zgodność wyników ujemnych n/N (%) (95-procentowy CI)	257/272 (94.5) (91.1–96.6)		
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	2637/2830 (93.2) (92.2–94.1)		

^a Dodatni = wynik dodatni metodą IHC i/lub amplifikacja metodą ISH. Ujemny = wynik ujemny metodą IHC i brak amplifikacji metodą ISH albo brak amplifikacji metodą ISH i wynik niedodatni metodą IHC.

^b IHC: dodatni = 3+; ujemny = 0, 1+ lub 2+.

Tab 45. Wartości zgodności klonu 4B5 i testów firmy Dako w kontekście określania statusu barwienia IHC dla wszystkich preparatów możliwych do oceny pod kątem barwienia IHC. Możliwe do oceny preparaty wybarwione metodą IHC miały status HER2 dodatni lub ujemny określony na podstawie barwienia przy użyciu klonu 4B5 oraz testu IHC kwalifikującego do badania klinicznego.

Badanie	Status wg klonu 4B5 ^a	Status wg testu Dako HercepTest ^a		
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
PERJETA i KADCYLA	Wynik dodatni	2330	65	2395
	Wynik ujemny	21	414	435
	Łącznie	2351	479	2830
	Procentowa zgodność wyników dodatnich n/N (%) (95-procentowy CI)	2330/2351 (99.1) (98.6–99.4)		
	Procentowa zgodność wyników ujemnych n/N (%) (95-procentowy CI)	414/479 (86.4) (83.1–89.2)		
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	2744/2830 (97.0) (96.3–97.5)		
PERJETA	Wynik dodatni	2267	63	2330
	Wynik ujemny	10	399	409
	Łącznie	2277	462	2739
	Procentowa zgodność wyników dodatnich n/N (%) (95-procentowy CI)	2267/2277 (99.6) (99.2–99.8)		
	Procentowa zgodność wyników ujemnych n/N (%) (95-procentowy CI)	399/462 (86.4) (82.9–89.2)		

Badanie	Status wg klonu 4B5 ^a	Status wg testu Dako HercepTest ^a		
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	Łącznie
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	2666/2739 (97.3) (96.7–97.9)		
KADCYLA	Wynik dodatni	63	2	65
	Wynik ujemny	11	15	26
	Łącznie	74	17	91
	Procentowa zgodność wyników dodatnich n/N (%) (95-procentowy CI)	63/74 (85.1) (75.3–91.5)		
	Procentowa zgodność wyników ujemnych n/N (%) (95-procentowy CI)	15/17 (88.2) (65.7–96.7)		
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	78/91 (85.7) (77.1–91.5)		

^a Dodatni = 3+; ujemny = 0, 1+ lub 2+.

Tab 46. Wartości zgodności klonu 4B5 i testów firmy Dako w kontekście oceny barwienia IHC dla wszystkich preparatów możliwych do oceny pod kątem barwienia IHC. Możliwe do oceny preparaty wybarwione metodą IHC miały status HER2 dodatni lub ujemny określony na podstawie barwienia przy użyciu klonu 4B5 oraz testu IHC kwalifikującego do badania klinicznego.

Badanie	Ocena barwienia klonem 4B5	Ocena Dako HercepTest			
		3+	2+	0/1+	Łącznie
PERJETA i KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Łącznie	2351	325	154	2830
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	2703/2830 (95.5) (94.7–96.2)			
PERJETA	3+	2267	62	1	2330
	2+	9	226	13	248
	0/1+	1	24	136	161

		Ocena Dako HercepTest			
Badanie	Ocena barwienia klonem 4B5	3+	2+	0/1+	Łącznie
	Łącznie	2277	312	150	2739
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	2629/2739 (96.0) (95.2–96.7)			
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Łącznie	74	13	4	91
	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem n/N (%) (95-procentowy CI)	74/91 (81.3) (72.1–88.0)			

Tab 47. Akceptowalność barwienia klonem 4B5. Badane preparaty wybarwione metodą IHC. Barwienie IHC uznawano za akceptowalne, jeśli dla preparatu można było określić ważną ocenę barwienia IHC (0, 1+, 2+ lub 3+). Przyczyny nieakceptowalnego wybarwienia były następujące: nieakceptowalne wybarwienie kontroli ujemnej, utrata tkanki, niewystarczająca ilość guza, nieakceptowalne wybarwienie tła oraz nieakceptowalna morfologia.

Parametr	PERJETA	KADCYLA	PERJETA i KADCYLA
Liczba wstępnych testów IHC	2753	99	2852
Akceptowalność barwienia wstępnego n/N (%) (95-procentowy CI)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Liczba powtórnych testów IHC	40	0	40
Akceptowalność barwienia końcowego n/N (%) (95-procentowy CI)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

Badanie rezultatu klinicznego — KATHERINE

Działanie klonu 4B5 skierowanego przeciwko białku HER2 i testu INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (test INFORM HER2 Dual ISH) zostało zbadane w randomizowanym, wieloośrodkowym, otwartym badaniu fazy III KATHERINE (BO27938) w celu oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowania trastuzumabu emtanzyny (KADCYLA) i trastuzumabu (Herceptin) jako terapii adiuwantowej wśród pacjentów z pierwotnym rakiem sutka o dodatnim statusie HER2, u których po zastosowaniu terapii

przedoperacyjnej (NCT01772472) w sutku lub węzłach chłonnych pachowych patologicznie występuje guz resztkowy.

Próbki pacjentów zostały wybarwione przy użyciu klonu 4B5 i/lub testu INFORM HER2 Dual ISH, a następnie ocenione pod kątem dopuszczalności barwienia i statusu HER2. Większość z nich to próbki biopsyjne uzyskane przed rozpoczęciem leczenia (80.9%), pobrane głównie w formie biopsji (75.3%) lub metodami chirurgicznymi (24.3%). Więcej próbek wykazywało podtyp nowotworu przewodowego (95.4%) i większości z nich nie pozyskano z próbki guza przerzutowego (96.2%).

Do badania KATHERINE włączono 1486 pacjentów ze wczesnym rakiem sutka o dodatnim statusie HER2 z resztkowym guzem inwazyjnym zlokalizowanym w sutku i/lub węzłach chłonnych pachowych, którzy zostali poddani terapii taksanem i trastuzumabem, będącej częścią leczenia z zastosowaniem neoadiuwantowej chemioterapii przed włączeniem do badania. Równolegle do terapii zastosowanej w ramach badania pacjenci zostali poddani radioterapii i/lub terapii hormonalnej zgodnie z lokalnymi wytycznymi. Próbki guza sutka musiały wykazywać nadekspresję HER2 definiowaną jako ocena IHC 3+ lub współczynnik amplifikacji określony metodą ISH o wartości ≥ 2.0 wyznaczone w laboratorium centralnym. Pacjentów przydzielano losowo (w stosunku 1:1) do grup otrzymujących preparat trastuzumab lub KADCYLA. Randomizacja była stratyfikowana według stadium klinicznego w momencie rozpoznania, statusu receptora hormonu, terapii przedoperacyjnej skierowanej przeciwko białku HER2 (trastuzumab, trastuzumab z dodatkowymi środkami skierowanymi przeciwko białku HER2) i statusu patologicznych węzłów chłonnych ocenionych po zastosowaniu terapii przedoperacyjnej.

Pierwszorzędownym punktem końcowym określającym skuteczność w badaniu KATHERINE było przeżycie wolne od choroby inwazyjnej (IDFS). Wartość IDFS zdefiniowano jako czas od daty randomizacji do pierwszego wystąpienia nawrotu inwazyjnego guza sutka występującego po tej samej stronie, nawrotu miejscowego lub regionalnego inwazyjnego raka sutka występującego po tej samej stronie, wznowy odległej, przeciwnostronnego inwazyjnego raka sutka lub śmierci z jakiegokolwiek przyczyny.

Wśród pacjentów, których próbki raka sutka zidentyfikowano jako dodatnie względem białka HER2 za pomocą barwienia IHC przy użyciu testu wykorzystującego klon 4B5, poddanych terapii trastuzumabem emtanzyną (KADCYLA) zaobserwowano statystycznie istotną i klinicznie znaczącą poprawę wartości IDFS w porównaniu do terapii trastuzumabem (Herceptin) (HR = 0.43, 95-procentowy CI [0.32, 0.58]), co odpowiada 57-procentowej redukcji ryzyka wystąpienia zdarzenia IDFS. Wyniki skuteczności dla podgrupy pacjentów o dodatnim wyniku barwienia IHC zawiera Tab 48.

Analiza danych wskazuje również, że zarówno z dostosowaniem pod kątem próbkowania zróżnicowanego w populacji badanej ze względu na lokalne wstępne testy przesiewowe, jak i bez niego oszacowania skuteczności leków są podobne.

Tab 48. Wyniki skuteczności z badania KATHERINE dla podgrupy pacjentów o dodatnim wyniku barwienia IHC.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
Pierwszorzędowny punkt końcowy	Przeżycie wolne od choroby inwazyjnej (IDFS) ^a	
Liczba (%) pacjentów ze zdarzeniem	64 (11.2%)	130 (23.3%)
HR [95-procentowy CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
Współczynnik procentowy „3 lata bez zdarzenia” ^b	89.0	75.7

^a Dane z pierwszej analizy okresowej

^b Współczynnik „3 lata bez zdarzenia” obliczony z estymatorów Kaplana-Meiera

Dane z badania KATHERINE wskazują, że wśród pacjentów z wczesnym rakiem sutka o dodatnim statusie HER2, z chorobą resztkową pozostałą po ukończonej terapii neoadiuwantowej, preparat adiuwantowy trastuzumab emtanzyna (KADCYLA) wykazywał wyraźne korzyści w leczeniu w porównaniu z preparatem adiuwantowym trastuzumab (Herceptin). Test wykorzystujący klon 4B5 skierowany przeciwko białku HER2 oraz test INFORM HER2 Dual ISH są przydatne podczas identyfikacji pacjentów, którzy najprawdopodobniej odniosą korzyść z terapii trastuzumabem emtanzyną (KADCYLA).

Rak żołądka

Porównanie działania klonu 4B5 do działania testu HercepTest podczas barwienia tkanek ludzkiego raka żołądka

Przeprowadzono zewnętrzne, zaślepienie badanie w celu porównania skuteczności barwienia przy użyciu klonu 4B5 i aparatu BenchMark XT z barwieniem przy użyciu testu Dako HercepTest. W badaniu testowano dwie kohorty próbek; kohorta 1 obejmowała nowo utworzone mikromacierze tkankowe (TMA) składające się z 248 przypadków raka żołądka (sześć przypadków później uznano za duplikaty i zostały usunięte); kohorta 2 składała się z zestawu 183 próbek z badania klinicznego ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer), podczas którego badano status białka HER2 i wyniki kliniczne wśród pacjentów leczonych preparatem Herceptin (trastuzumab). W laboratorium preparaty wybarwiono przy użyciu klonu 4B5 i testu HercepTest. Łącznie 431 przypadków wybarwiono za pomocą obu testów, a w porównaniu uwzględniono 398 odrębnych przypadków (po usunięciu przypadków zduplikowanych). Patomorfolog oceniał przypadki, stosując skalę ocen 0/1+, 2+ i 3+. Przypadki z oceną 2+ lub 3+ uznawano za dodatnie, natomiast przypadki z oceną 0 lub 1+ uznawano za ujemne. Wartości zgodności między klonem 4B5 i testem HercepTest dla obu badanych kohort przedstawiono w poniższej tabeli.

Tab 49. Dane dotyczące zgodności wyników uzyskanych przy użyciu klonu 4B5 (IHC) i testu HercepTest w przypadku próbek raka żołądka.

Pochodzenie tkanki	Procentowa zgodność wszystkich wyników ogółem (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników dodatnich (95-procentowy CI)	Procentowa zgodność wyników ujemnych (95-procentowy CI)
TMA ^a i ToGA ^b	91.0 (87.7–93.4)	82.1 (70.2–90.0)	92.4 (89.1–94.8)
n	362/398	46/56	316/342

Wyniki barwienia IHC były określane jako dodatnie (2+ i 3+) i ujemne (0+ i 1+).

^a TMA: próbki z mikromacierzy tkankowej

^b ToGA: próbki kliniczne z badania klinicznego ToGA

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

- Jeśli kontrola dodatnia wykazuje słabsze wybarwienie niż oczekiwano, należy sprawdzić barwienie w innych kontrolach dodatnich wybarwionych podczas tego samego cyklu barwienia, aby określić, czy problem jest spowodowany przeciwciałem pierwszorzędowym, czy jednym z powszechnie stosowanych odczynników drugorzędowych.
- Jeśli dla kontroli dodatniej otrzymano wynik ujemny, należy upewnić się, że preparat jest oznaczony odpowiednią etykietą z kodem kreskowym. Jeśli preparat jest oznaczony prawidłową etykietą, należy sprawdzić barwienie w innych kontrolach dodatnich wybarwionych podczas tego samego cyklu barwienia, aby określić, czy problem jest spowodowany przeciwciałem pierwszorzędowym, czy jednym z powszechnie stosowanych odczynników drugorzędowych. Tkanki mogły zostać niewłaściwie pobrane, utrwalone lub odparafinowane. Przestrzegać odpowiednich procedur pobierania, przechowywania i utrwalaania.
- Jeśli nie usunięto całej parafiny, może nie dojść do wybarwienia preparatu. Należy powtórzyć procedurę odparafinowania.
- Jeśli skrawki tkanek są wypłukiwane ze szkiełek, należy sprawdzić, czy szkiełka są naładowane dodatnio.
- Jeśli w tkance raka żołądka w prawidłowej błonie śluzowej znajdującej się w bliskim sąsiedztwie obszaru guza, występuje barwienie jądrowe i odczyn cytoplazmatyczny utrudniające interpretację zabarwienia błony, tkankę tę można zbadać przy użyciu metody ISH.
- Aby uzyskać informacje o środkach zaradczych należy zapoznać się z częścią „Procedura barwienia” lub przewodnikiem użytkownika aparatu albo skontaktować się z lokalnym przedstawicielem działu pomocy technicznej.

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.

- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
- Schrohl AS, Pedersen HC, Jensen SS, Nielsen SL, Brünner N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) immunoreactivity: specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. Histopathology. 2011;59(5):975-983.
- Jay JL, Brunhoeber PS, Smith MH, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). Histopathology. 2013;62(4):563-577.
- Moasser MM. The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
- 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.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
- Tarantino P, Hamilton E, Tolane SM, et al. HER2-low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. J Clin Oncol. 2020;38:1951-1962.
- Osborne CK, Shou J, Massarweh S, et al. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. Clin Cancer Res 11:865s-870s, 2005.
- Eiger D, Agostinetto E, Saude-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-low Breast Cancer Treatment. Cancers (Basel). 2021;13.
- Zhang H, Katerji H, Turner BM, Hicks DG. HER2-low Breast Cancers. Am J Clin Pathol. 2021.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376: 687-697.
- Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. Gastrointest Endosc. 2019;90(1):44-54.
- Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Ann Oncol. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
- Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. Gastric Cancer. 2015;18(3):476-484.
- The Global Cancer Observatory: Cancer Today (GLOBOCAN) 2020. International
- 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;142:1364-1382.
- Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.
- 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.
- 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.
- 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.
- Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.

25. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(8):1154-1161.
26. Modi S, Park H, Murthy RK, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. J Clin Oncol. 2020;38:1887-1896.
27. Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer [published online ahead of print, 2022 Jun 5]. N Engl J Med. 2022;10.1056/NEJMoa2203690.
28. Cislo M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, et al. Distinct Molecular Subtypes of Gastric Cancer: From Lauren to Molecular Pathology. Oncotarget. 2018;9(27):19427-19442.
29. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
30. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
31. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
32. 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.
33. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
34. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
35. 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.
36. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008;52:797-805.
37. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
38. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
39. 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(5):626-32.
40. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
41. Ahn S, Woo JW, Lee K, et al. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. J Pathol Trans Med. 2020;54:34-44.
42. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, 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.
43. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
44. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

UWAGA: W tym dokumencie jako separator dziesiętny do zaznaczenia granicy między częścią całkowitą a ułamkową cyfry dziesiętnej zawsze używana jest kropka. Nie jest używany separator tysięcy.

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności można znaleźć pod adresem: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbole

Firma Ventana stosuje określone poniżej symbole i oznaczenia dodatkowo do symboli wymienionych w normie ISO 15223-1 (dotyczy USA: więcej informacji można znaleźć pod adresem elabdoc.roche.com/symbols).



Globalny Numer Jednostki Handlowej

Rx only

Dotyczy USA: Przestroga: Prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zlecenie lekarza.

HISTORIA ZMIAN

Wer.	Aktualizacje
C	Zaktualizowano informacje zawarte w części Procedura barwienia oraz zasady oceniania tkanek raka żołądka w Tabeli 7. Poprawki dotyczące terminologii i interpunkcji. Dodano informacje dotyczące aparatu BenchMark ULTRA PLUS.

WŁASNOŚĆ INTELEKTUALNA

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY i ULTRAVIEW są znakami towarowymi firmy Roche. Nazwy i znaki towarowe wszystkich pozostałych produktów stanowią własność odpowiednich właścicieli.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

DANE KONTAKTOWE



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

www.roche.com



0123