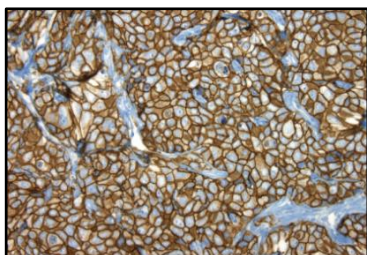


## PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

**REF** 790-2991

05278368001

**IVD**  50


1. pav. „PATHWAY HER2 (4B5)“ antikūno dažymas krūties karcinomos atveju.

### PASKIRTIS

„Ventana Medical Systems, Inc.“ („Ventana“) sukurtas „PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5))“ – tai triušio monokloninis antikūnas, skirtas naudoti laboratorijoje pusiau kiekybiniam HER2 antigeno aptikimui formaline fiksuotų, parafine įterptų normalių ir neoplastinių audinių pjūviuose, atlikus dažymą „BenchMark IHC/ISH“ prietaise. Šis gaminytis indikuojamas kaip krūties

vėžiu sergančių pacientų, kuriems svarstoma skirti gydymą „Herceptin®“ (trastuzumabu) ar KADCYLA® (ado-trastuzumabo emtanzinu), pagalbinė vertinimo priemonė.

Naudojant šį gaminį gaunamą rezultatą turi vertinti kvalifikuotas patologas, atsižvelgdamas į histologinį tyrimą, susijusią klinikinę informaciją ir tinkamas kontrolines medžiagas.

Šis antikūnas skirtas in vitro diagnostikai (IVD).

Pastaba. Visi „Herceptin“ klinikiniuose tyrimuose dalyvavę pacientai buvo atrinkti naudojant klinikinio tyrimo analizę. Jokie tyrimų dalyviai nebuvo atrinkti naudojant „PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)“. „PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)“ buvo palygintas su PATHWAY HER-2 (clone CB11) Primary Antibody naudojant atskirą mėginių rinkinį ir nustatyta, kad rezultatai yra priimtina suderinami. Faktinė „PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)“ koreliacija su klinikiniais rezultatais nenustatyta.

### SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

„PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ („PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas) – tai triušio monokloninis antikūnas, pagamintas prieš vidinį transmembraninio žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2 (HER2) domeną. HER2 klonavo Akiyama ir kt. 1986 m.<sup>1</sup> Nustatyta, kad klonas 4B5 reaguoja su 185 kD baltymu iš SK-BR-3 ląstelių lizatų per „Western“ blotingą. SK-BR-3 yra krūties karcinomos ląstelių linija, turinti 128 kartus padidėjusią HER2 mRNA ekspresiją.<sup>2</sup> Nustatytos juostos dydis puikiai koreliuoja su Akiyama ir kt. nurodytu dydžiu HER2 baltymui (185 kD).<sup>1</sup> Imunohistocheminiai (IHC) bandymai su transfekuotų ląstelių linijomis (HEK293) parodė, kad klonas 4B5 nudažo ląsteles, transfekuotas su HER2 ir su HER4. HER1 arba HER3 transfekuotų ląstelių nudažymas nepastebėtas. „Western“ blotingo duomenys su rekombinantiniu HER4 baltymu taip pat parodė, kad klonas 4B5 atpažįsta HER4 epitopą. HER2 yra maždaug 185 kDa transmembraninio receptoriaus tirozino kinazė, struktūriškai panaši į epidermio augimo faktoriaus receptorių (EGFR).<sup>3,4</sup> Genų amplifikacija ir atitinkama padidėjusi HER2 ekspresija nustatyta įvairiuose navikuose, įskaitant krūties karcinomas.<sup>3,4,5</sup> Dėl HER2 geno amplifikacijos, padidėjusi baltymo ekspresija yra pagrindinis varomasis HER2 medijuojamo navikinio vystymosi mechanizmas.<sup>3</sup> Perteklinė HER2 baltymo ekspresija ląstelių membranoje sustiprina signalo keitimą, kuris reguliuoja proliferaciją ir diferenciaciją bei galiausiai nulemia naviko susidarymą.<sup>3,4</sup>

Nuo 15 iki 30 procentų invazinio duktalinio vėžio atvejų pasižymi padidėjusia HER2 baltymo ekspresija ir (arba) genų amplifikacija.<sup>6,7</sup> Beveik visais Pageto krūties ligos atvejais ir iki 90 % duktalinės karcinomos atvejų in situ komedono tipo yra teigiami.<sup>6,8</sup>

### KLINIKINĖ REIKŠMĖ

Krūties vėžys yra dažniausia moterims pasitaikanti karcinoma bei antra dažniausia su vėžiu susijusios mirties priežastis.<sup>4,6</sup> Šiaurės Amerikoje vienai iš aštuonių moterų išsivysto krūties vėžys.<sup>4</sup> Ankstyvas aptikimas ir tinkamas gydymas gali gerokai padidinti bendrą išgyvenamumą.<sup>9,10</sup> Nedidelius audinių mėginius galima nesunkiai naudoti įprastuose IHC,

todėl šis metodas, kartu su antikūnais, kurie aptinka karcinomos interpretavimui svarbius antigenus, yra efektyvi priemonė patologams diagnozuojant ir prognozuojant ligą. Vienas šiomis dienomis svarbus krūties vėžio žymuo yra HER2.<sup>11-14</sup>

Nustatyta, kad gydomieji vaistai „Herceptin“ (trastuzumabas) ir KADCYLA (ado-trastuzumabo emtanzinas / trastuzumabo emtanzinas) padeda kai kuriems krūties karcinoma sergantiems pacientams, sustabdymui, o kai kuriais atvejais ir reversuodami vėžio augimą.<sup>9,14</sup> Vaistai yra humanizuoti monokloniniai antikūnai, kurie prisijungia prie HER2 baltymo ant vėžinių ląstelių.<sup>11,13,14</sup> Gydymas „Herceptin“ ar KADCYLA vaistais naudingas tik pacientams su HER2 teigiamomis krūties karcinomomis.<sup>11-14</sup> In vitro diagnostika vertinant HER2 būsena krūties karcinomų atveju yra svarbi priemonė gydytoji nustatant gydymą „Herceptin“ ar KADCYLA vaistais.<sup>11,12,14</sup> IHC pagrindu atliekamas HER2 baltymo ekspresijos aptikimas naudojamas kaip priemonė vertinant krūties vėžiu sergančių pacientus, kuriems svarstoma skirti gydymą „Herceptin“ arba KADCYLA vaistais.

Vertinant bet kokios HER2 aptikimo sistemos rezultatus reikia įvertinti faktą, kad HER2 yra išreiškiamas krūties vėžio navikuose bei sveikuose audiniuose, nors ir skirtinguose lygiuose ir skirtingais ekspresijos būdais.<sup>15</sup> Histologinis audinio paruošimas turi nepaveikto audinio morfologijos pranašumą vertinant mėginio HER2 teigiamumą. Histologiniai tyrimai turi būti aiškinami krūties vėžio morfologijos specialisto ir (arba) patologo, o rezultatai turi būti papildomi atliekant morfologinius tyrimus ir tinkamais kontroliniais audiniais bei naudojant kartu su kitais klinikiniais ir laboratoriniais duomenimis.

### PROCEDŪROS PRINCIPAS

„PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas yra triušio monokloninis antikūnas, kuris prisijungia prie HER2 formaline fiksuotose, parafine įterptuose (FFPE) audinių pjūviuose. Tam tikras antikūnas gali būti lokalizuotas naudojant biotinu konjuguoto antrinio antikūno junginį, kuris atpažįsta triušio imunoglobulinus, paskui pridodant streptavidino-krienu peroksidazės (HRP) konjugatą („VIEW DAB Detection Kit“) arba antrinio antikūno ir HRP konjugatą („ultraView Universal DAB Detection Kit“). Specifinis antikūno ir fermento kompleksas vizualizuojamas stabint fermentinės reakcijos produkto nuosėdas. Kiekvienas etapas inkubuojamas tiksliai nustatyta laiką ir konkrečioje temperatūroje. Kiekvieno inkubacijos etapo pabaigoje prietaisas išplauna pjūvius, kad sustabdytų reakciją ir pašalintų nesurištas medžiagas, kurios trukdytų norimai reakcijai vėlesniuose etapuose. Prietaisas uždeda skystą dengiamąjį stiklėlį, kuris sumažina vandeninių reagentų garavimą nuo mėginio objekcinio stiklelio.

Klinikiniai atvejai turi būti vertinami atsižvelgiant į atitinkamų kontrolinių medžiagų veikimą. Rekomenduojama naudoti teigiamą audinio kontrolę, fiksuotą ir apdorotą taip pat, kaip ir paciento mėginys (pavyzdžiui, silpnai teigiamą krūties karcinoma). Be „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu nudažyto objekcinio stiklelio taip pat reikia naudoti antrą objekcinį stiklėlį, nudažytą „CONFIRM Negative Control Rabbit Ig“. Kad tyrimas būtų laikomas tinkamu, teigiamas kontrolinis audinys turi nudažyti navikinių ląstelių membranas. Šie komponentai turi būti neigiami, kai dažoma naudojant „CONFIRM Negative Control Rabbit Ig“. Be to, rekomenduojama neigiamą audinio kontrolę (pvz., HER2 neigiamą krūties karcinoma) įtraukti į kiekvieną mėginių partiją, kuri buvo apdorota ir iširta naudojant „BenchMark IHC/ISH“ prietaisą. Šis neigiamas kontrolinis audinys turi būti nudažytas „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu, kad įsitikintumėte, jog dėl antigenų patobulinimų ir kitų pirminio apdoravimo procedūrų nebus gautas klaidingai teigiamas nudažymas. Naudojant VENTANA iš anksto atskiestą „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną ir paruoštus naudoti „VIEW DAB“ ir „ultraView Universal DAB Detection“ rinkinius kartu su „BenchMark IHC/ISH“ prietaisu, sumažėja žmogieskiųjų klaidų tikimybė ir būdingas kintamumas, atsirandantis dėl atskiro reagento skiedimo, rankinio pipetavimo ir rankinio reagento įlašavimo.

### RINKINYJE ESANTI MEDŽIAGA

„PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno rinkinyje esančio reagento pakanka 50 tyrimų. Viename 5 mL „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dozatoriuje yra maždaug 30 µg triušio monokloninio antikūno, nukreipto prieš žmogaus HER2 antigeną. Antikūnas yra atskiestas 0.05 M „Tris“ buferiniu druskos tirpalu, 0.01 M EDTA, 0.05 % „Brij-35“ su 0.3 % nešančiuoju baltymu ir 0.05 % natrio azidu (konservantas). Iš pradinio tirpalo yra likę apie 0.25 % fetalinio veršelio serumo pėdsakų.

Specifinio antikūno koncentracija yra maždaug 6 µg/mL.

„PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas yra triušio IgG, atskiestas iš audinio kultūrų supematantų.

Prireikus išsamų procedūros principo, medžiagos ir metodų, mėginių paėmimo ir paruošimo analizei, kokybės kontrolės procedūrų, trikčių diagnostikos, rezultatų interpretavimo ir apribojimų aprašymų, žr. atitinkamą VENTANA aptikimo rinkinio metodo lapą.

## REIKALINGOS, TAČIAU Į RINKINĮ NEĮEINANČIOS MEDŽIAGOS

Dažymo reagentai, tokie kaip VENTANA aptikimo rinkiniai ir pagalbiniai komponentai, įskaitant neigiamą ir teigiamą audinio kontrolinius objektinius stiklelius, į rinkinį neįeina. Kai kurie metodo lape išvardyti gaminiai gali būti neprieinami visuose regionuose. Kreipkitės į vietinį pagalbos tarnybos atstovą.

Toliau išvardytos medžiagos ir reagentai nepridedami, tačiau gali būti reikalingi dažymui atlikti.

1. Rekomenduojamas kontrolinis audinys
2. Mikroskopiniai objektiniai stikleliai, „Superfrost Plus“ (VWR kat. Nr. 48311-703 arba ekvivalentiški)
3. „CONFIRM Negative Control Rabbit Ig“ (kat. Nr. 760-1029 / 05266238001)
4. „VIEW DAB Detection Kit“ (kat. Nr. 760-091 / 05266157001)
5. „ultraView Universal DAB Detection Kit“ (kat. Nr. 760-500 / 05269806001)
6. „EZ Prep Concentrate (10X)“ (kat. Nr. 950-102 / 05279771001)
7. „Reaction Buffer Concentrate (10X)“ (kat. Nr. 950-300 / 05353955001)
8. „LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-010 / 05264839001)
9. „ULTRA LCS (Predilute)“ (kat. Nr. 650-210 / 05424534001)
10. „Cell Conditioning Solution (CC1)“ (kat. Nr. 950-124 / 05279801001)
11. „ULTRA Cell Conditioning“ (ULTRA CC1) (kat. Nr. 950-224 / 05424569001)
12. „Hematoxylin II“ (kat. Nr. 790-2208 / 05277965001)
13. „Bluing Reagent“ (kat. Nr. 760-2037 / 05266769001)
14. Nuolatinė paruošimo terpė
15. Dengiamasis stiklis
16. Automatinis dengiamųjų stikelių uždėjimo įtaisas
17. Bendrosios paskirties laboratorinė įranga
18. „BenchMark IHC/ISH“ prietaisas

## LAIKYMAS IR STABILUMAS

Po pristatymo ir nenaudojant, gaminį reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Neužšaldyti.

Norėdami užtikrinti tinkamą reagento tiekimą ir antikūno stabilumą, pakeiskite dozatoriaus kamštelį po kiekvieno naudojimo ir nedelsdami įdėkite dozatorių į šaldytuvą vertikaliaje padėtyje.

Kiekvienas antikūno dozatorius turi galiojimo terminą. Tinkamai laikomas reagentas yra stabilus iki etiketėje nurodytos dienos. Nenaudokite reagento, jei jo galiojimo terminas yra pasibaigęs.

## MĖGINIO PARUOŠIMAS

Įprastai apdorojami FFPE audiniai yra tinkami naudoti su šiuo pirminiu antikūnu, jei jie naudojami su VENTANA aptikimo rinkiniais ir „BenchMark IHC/ISH“ prietaisu. Objektiniai stikleliai turėtų būti nudažyti nedelsiant, nes audinio pjūvių antigeniškumas laikui bėgant gali sumažėti. Rekomenduojamas audinio fiksavimas yra 10 % neutralus buferinis formalinas.<sup>16</sup> Naudojamas kiekis turi būti 15–20 kartų didesnis už audinio tūrį. Fiksatorius per 24 valandas neprasisakverbs daugiau nei 2–3 mm į kietąjį audinį arba 5 mm į akytą audinį. 3 mm arba mažesnis audinio pjūvis turi būti fiksuotas ne mažiau nei 4 val. ir ne daugiau nei 8 val. Fiksavimą galima atlikti kambario temperatūroje (15–25 °C).<sup>16</sup>

Tinkamai fiksuoti ir įterpti audiniai, kuriuose vyksta antigeno ekspresija, išlieka stabilūs bent 2 metus, jei jie laikomi vėsioje vietoje (15–25 °C). Pagal 1988 m. klinikinės laboratorijos patobulinimo akto (angl. „Clinical Laboratory Improvement Act“ – CLIA) 42CFR493.1259 (b) dalį reikalaujama, kad „laboratorija saugotų nudažytus objektinius stiklelius mažiausiai dešimt metų nuo tyrimo atlikimo datos ir saugotų mėginių blokus mažiausiai du metus nuo tyrimo atlikimo datos“.

Atpjauti ir ant objektinių stikelių padėti reikia maždaug 5 µm storio pjūvius. Objektiniai stikleliai turi būti „Superfrost Plus“ arba ekvivalentiški. Audiniai turi būti džiovinami ore, palikus objektinius stiklelius per naktį kambario temperatūroje.<sup>17</sup> „Ventana“ tyrimai rodo, kad ore išdžiovinoti atpjauti audiniai ir laštelių linijų pjūviai, laikomi 2–8 °C temperatūros aplinkoje, stabilūs išlieka iki 6 mėnesių. Kiekviena laboratorija turi patvirtinti pjūvio objekcinio stiklio stabilumą atsižvelgdama į atliekamas procedūras ir laikymo aplinkos sąlygas.

Rekomenduojama su nežinomais mėginiais kartu tirti teigiamą ir neigiamą kontrolinius audinius.

## ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Skirta in vitro diagnostikai (IVD).
2. Gali naudoti tik profesionalai.

3. **DĖMESIO.** Jungtinėse Amerikos Valstijose pagal federalinius įstatymus šį prietaisą galima parduoti tik gydytojui arba jo užsakymu. („Rx Only“)
4. **Neviršykite nurodyto tyrimų skaičiaus.**
5. Teigiamo krūvio objektiniai stikleliai gali būti jautrūs aplinkos poveikiui, dėl to dažymas gali būti netinkamas. Daugiau informacijos apie tai, kaip naudoti tokio tipo objektinius stiklelius, klauskite „Roche“ atstovo.
6. Žmogaus ar gyvūninės kilmės medžiagos turi būti laikomos biologiškai kenksmingomis ir jas reikia šalinti taikant atitinkamas atsargumo priemones. Medžiagoms paveikus žmogaus organizmą, reikia vadovautis atsakingųjų institucijų pateiktomis sveikatos direktyvomis.<sup>18,19</sup>
7. Venkite reagento patekimo į akis ir gleivines. Jei reagento pateko į jautrias vietas, plaukite dideliu kiekiu vandens.
8. Saugokite reagentus nuo užteršimo mikrobais, nes dėl jų gali būti gauti klaidingi rezultatai.
9. Naudojant pagal instrukcijas, šis gaminys nėra klasifikuojamas kaip pavojingoji medžiaga. Reagento sudėtyje yra konservanto natrio azido. Natrio azido poveikio simptomai gali būti odos ir akių dirginimas, gleivinės ir viršutinių kvėpavimo takų dirginimas. Natrio azido koncentracija šiame gaminyje yra 0.05 % ir yra mažesnė nei pavojingoms medžiagoms taikomi kriterijai. Na<sub>3</sub> sankaupos gali reaguoti su švininiais ir variniais vamzdžiais, suformuodamos labai sprogus metalų azidus. Šį produktą šalinkite nuplaudami dideliu kiekiu vandens, kad apsaugotumėte vamzdyną nuo metalų azidų sankaupų.<sup>20</sup> Jautriems asmenims gali pasireikšti sisteminės alerginės reakcijos.
10. Prireikus daugiau informacijos apie šio gaminio naudojimą, žr. „BenchMark IHC/ISH“ prietaiso naudotojo vadovą ir visų reikiamų komponentų naudojimo instrukcijas, kurias galite rasti [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com).
11. Dėl rekomenduojamų šalinimo metodų kreipkitės į vietas ir (arba) valstybės institucijas.
12. Gaminio saugos etiketės daugiausia paremtos ES GHS gairėmis. Saugos duomenų lapai pateikiami profesionaliems naudotojams paprašius.
13. Norėdami pranešti apie pavojingus incidentus, susijusius su šiuo gaminiu, susisiekiate su vietiniu „Roche“ atstovu ir valstybės narės ar šalies, kurioje gyvena naudotojas, kompetentinga institucija.

## DAŽYMO PROCEDŪRA

VENTANA pirminiai antikūnai skirti naudoti „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose kartu su VENTANA aptikimo rinkiniais ir priedais. Rekomenduojami dažymo protokoliai nurodyti toliau pateiktose lentelėse. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas patvirtintas naudoti Jungtinėse Valstijose, naudojant PATHWAY dažymo procedūrą rekomenduojamiems dažymo protokolams.

Šis antikūnas pritaikytas konkrečioms inkubavimo trukmėms, tačiau naudotojas privalo patvirtinti rezultatus, gautus naudojant šį reagentą. Prieš naudojimą „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnui reikia leisti pastovėti bent 30 minučių kambario temperatūroje.

Automatizuotos procedūros parametrus galima peržiūrėti, išspausdinti ir taisyti pagal prietaiso naudotojo vadove pateiktą procedūrą. Prireikus išsamesnės informacijos apie IHC dažymo procedūras, žr. atitinkamo VENTANA aptikimo rinkinio metodo lapą.

Prireikus daugiau informacijos apie tinkamą šio prietaiso naudojimą, žr. įtaisyto dozatoriaus metodo lapą, kuriam priskirtas dalies Nr. 790-2991.

**1. lent.** Rekomenduojamas „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo naudojant „VIEW DAB Detection Kit“ protokolas „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose.

Procedūros tipas	Metodas		
	BenchMark	XT	ULTRA
Kaitinimas	Nėra	Nėra	Nėra
Deparafinavimas	Pasirinktas	Pasirinktas	Pasirinktas
Laštelių kondicionavimas (antigeno demaskavimas)	CC1, standartinis	CC1, standartinis	ULTRA CC1, silpnas
Antikūnas (pirminis)	32 min., 37 °C	32 min., 37 °C	24 min., 36 °C

Procedūros tipas	Metodas		
	BenchMark	XT	ULTRA
A/B Blocking (Biotin Blocking)	Reikalingas		
Kontrastinis dažymas	„Hematoxylin II“, 4 min.		
Apdorojimas po kontrastinio dažymo	„Bluing“, 4 min.		

2. lent. Rekomenduojamas „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo naudojant „ultraView Universal DAB Detection Kit“ protokolas „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose pagal PATHWAY dažymo procedūrą.

Procedūros tipas	Metodas	
	XT	ULTRA arba ULTRA PLUS
Dažymo procedūra:	XT <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5	U <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5
Deparafinavimas	Pasirinktas	Pasirinktas
Ląstelių kondicionavimas (antigeno demaskavimas)	CC1, silpnas	ULTRA CC1, silpnas
Fermentas (proteazė)	Nereikia	Nereikia
Antikūnas (pirminis)	16 min., 37 °C	12 min., 36 °C
Kontrastinis dažymas	„Hematoxylin II“, 4 min.	
Apdorojimas po kontrastinio dažymo	„Bluing“, 4 min.	

3. lent. Rekomenduojamas „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo naudojant „ultraView Universal DAB Detection Kit“ protokolas „BenchMark IHC/ISH“ prietaisuose pagal „ultraView“ dažymo procedūrą.

Procedūros tipas	Metodas	
	XT	ULTRA arba ULTRA PLUS
Dažymo procedūra:	XT <i>ultraView</i> v3	U <i>ultraView</i> DAB
Deparafinavimas	Pasirinktas	Pasirinktas
Ląstelių kondicionavimas (antigeno demaskavimas)	„Cell Conditioning 1“, silpnas	ULTRA CC1, silpnas
Fermentas (proteazė)	Nereikia	Nereikia
Antikūnas (pirminis)	16 minučių, 37 °C	12 minučių, 36 °C
ultraWash	Pasirinktas	Pasirinktas
Kontrastinis dažymas	„Hematoxylin II“, 4 min.	
Apdorojimas po kontrastinio dažymo	„Bluing“, 4 min.	

Dėl audinio fiksavimo, apdoravimo, pagrindinio laboratorijos prietaiso ir aplinkos sąlygų kintamumo gali reikėti padidinti arba sumažinti pirminio antikūno inkubacijos, ląstelių kondicionavimo ar proteazės pirminio apdoravimo intensyvumą pagal atskirus mėginius, naudojamą aptikimo metodą ir vertintoją. Prireikus daugiau informacijos apie fiksavimo kintamuosius, žr. leidinį „Immunohistochemistry Principles and Advances“.<sup>21</sup>

## KOKYBĖS KONTROLĖS PROCEDŪROS

Remiantis optimalia laboratorine praktika, tame pačiame objektyviame stiklelyje, kuriame yra tiriamasis audinys, reikia naudoti teigiamą kontrolinį pjūvį. Jis padeda identifikuoti netinkamo reagentų užlašinimo ant stiklelio atvejus. Kokybės kontrolei geriausia naudoti audinį, kuriam pasireiškia silpna teigiamo nusidažymo reakcija. Kontroliniame audinyje gali būti tiek teigiamų, tiek neigiamų dažomųjų elementų ir jis gali būti naudojamas kaip teigiama arba neigiama kontrolinė medžiaga. Kontrolinio audinio mėginys turi būti neseniai atliktos autopsijos, biopsijos ar chirurginiu būdu paimtas mėginys ir paruoštas arba užfiksuotas kuo greičiau, tokiu pat būdu kaip tiriami pjūviai.

Žinomus teigiamus kontrolinius audinius reikia naudoti tik siekiant stebėti reagentų ir prietaisų efektyvumą, o ne kaip pagalbinę priemonę tiriamų mėginių diagnozei nustatyti. Jei teigiamame kontroliniame audinyje nepasireiškia teigiamas nusidažymas, tiriamo mėginio rezultatai turi būti laikomi negaliojančiais.

Šio antikūno teigiamų kontrolinių audinių pavyzdžiai yra silpnai teigiami krūties karcinomos audiniai.

## Ląstelių linijos sistemos kontrolės

„Ventana“ kaip atskirą gaminį siūlo keturias formaline fiksuotas, parafine įterptas ląstelių linijos kontroles, padalintas ir uždėtas ant atskirų įkrautų objektyvių stiklelių (P/N 781-2991). „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ gali praversti preliminariai vertinant apdoravimo metodus, naudojamus objektyviams stikliams dažyti „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu. Keturių ląstelių linijos kontrolės charakterizuojamos in situ hibridizacijos būdu genų kopijos numeriai, 4. lent. Tinkamai apdorojus ir nudažius, ląstelių linijos turėtų nusidažyti, kaip nurodoma „PATHWAY Her-2 4 in 1 Control Slide“ metodo lape. Jei nurodyto dažymo atitinkamose vietose nematyti, ypač 1+ ir 2+ kontrolėse, audinių dažymą reikia pakartoti.

4. lent. „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ charakteristikos.

HER2 IHC balas	Ląstelių linija	HER2/Chr17 santykis*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

\* HER2/Chr17 santykis yra trijų „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ partijų vidurkis, nustatytas naudojant fluorescencinę in situ hibridizaciją (FISH)

## Teigiama audinio kontrolė

Taip pat kaip paciento mėginius fiksuotą ir apdorotą teigiamą kontrolinį audinį reikia išanalizuoti pagal tyrimo sąlygas ir su kiekvienu „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo procedūra. Šiame audinyje gali būti tiek teigiamai nusidažančių ląstelių / audinių komponentų, tiek neigiamų ląstelių / audinių komponentų. Tai gali būti teigiamas ir neigiamas kontrolinis audinys. Kontrolinis audinys turi būti neseniai atliktos autopsijos / biopsijos / chirurginiu būdu paimtas mėginys, paruoštas ir užfiksuotas kuo greičiau, tokiu pat būdu kaip tiriami pjūviai. Šis audinys gali būti naudojamas visiems analizės etapams stebėti – nuo audinių paruošimo iki dažymo. Audinių pjūviai, fiksuoti arba apdoroti kitaip negu tiriami mėginiai, yra visų reagentų ir metodo veiksmų, išskyrus fiksavimą ir audinių paruošimą, kontrolė. Audinys su silpnu teigiamu nusidažymu yra tinkamesnis už stiprų teigiamą nusidažymą optimaliai kokybės kontrolei ir nedideliame reagento degradacijos lygiui aptikti. Idealiu atveju reikėtų pasirinkti audinį, kurio nusidažymas yra silpnas, tačiau teigiamas, kad sistema būtų jautri nedideliui reagentų degradacijai ar IHC metodikos problemoms. Vis dėlto, įprastai neoplastiniai audiniai su nustatytu teigiamu HER2 yra stipriai teigiami dėl patologijos pobūdžio (padidėjusios ekspresijos). Teigiamos „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno kontrolės pavyzdys yra žinoma silpnai HER2 teigiama invazinė krūties karcinoma (pvz., duktalinė arba lobulinė). Teigiamai nusidažantys audinių komponentai (neoplastinių ląstelių membrana) naudojami siekiant patvirtinti, kad antikūnas buvo panaudotas ir kad prietaisas veikia tinkamai.

Žinomame silpnai HER2 teigiamame invazinės krūties karcinomos audinyje gali būti tiek teigiamai, tiek neigiamai nusidažančių ląstelių ar audinių komponentų ir jis gali būti naudojamas kaip teigiamas arba neigiamas kontrolinis audinys.

Žinomas teigiamas audinių kontrolės reikia naudoti tik kaip apdorojamų audinių ir tyrimo reagentų veiksmingumo stebėjimo priemonę, o ne kaip pagalbinę priemonę pacientų mėginių diagnozei nustatyti.



## Neigiamas kontrolinis audinys

Tas pats audinio objektinis stiklėlis, naudojamas teigiamai audinio kontrolei (duktalinė arba lobulinė invazinė krūties karcinoma), gali būti naudojamas kaip neigiama audinio kontrolė. Nedažantys komponentai (supanti stroma, limfoidinės ląstelės ir kraujagyslės) turėtų rodyti specifinio dažymo nebuvimą bei nurodyti specifinį fono dažymą su pirminiu antikūnu. Naudokite audinį, kuris, kaip žinoma, yra fiksuojamas, apdorojamas ir įterpiamas taip pat, kaip ir paciento mėginys (-iai) su kiekviena dažymo serija „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno specifiskumui patikrinti ir specifinio fono dažymo indikacijai užtikrinti (klaidingai teigiamas dažymas).

## Neigiama reagento kontrolė

Neigiamas kontrolinis reagentas turi būti apdorojamas kiekvienam mėginiui rezultatų interpretavimui. Neigiamas kontrolinis reagentas naudojamas vietoje pirminio antikūno, siekiant įvertinti nespecifinį nusidažymą. Objektinį stiklėlį reikia dažyti naudojant „CONFIRM Negative Control Rabbit Ig“. Neigiamo kontrolinio reagento inkubacinis laikotarpis turėtų būti lygus pirminio antikūno inkubacijos laikotarpiui.

## Nepaaiškinami neatitikimai

Apie nepaaiškinamus kontrolinės medžiagos neatitikimus būtina nedelsiant pranešti vietiniam pagalbos tarnybos atstovui. Jeigu kokybės kontrolės rezultatai neatitinka specifikacijų, pacientų rezultatai yra negaliojantys. Žr. skyrių „Trikių diagnostika“. Nustatykite ir ištaisyskite problemą, tada iš naujo ištrikite pacientų mėginius.

## Tyrimo patikra

Prieš pirmą antikūno ar dažymo sistemos naudojimą diagnostikai, būtina patikrinti antikūno specifiskumą, išbandant jį su įvairiais audiniais su žinomomis imunohistocheminio efektyvumo charakteristikomis, reprezentuojančiais žinomus teigiamus ir neigiamus audinius (žr. šiame pakuotės lapelio skyriuje pirmiau aprašytas kokybės kontrolės procedūras ir leidinyje „College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program“, „Anatomic Pathology Checklist“<sup>22</sup> arba „CLSI Approved Guideline“<sup>23</sup> arba abiejuose dokumentuose pateiktas kokybės kontrolės rekomendacijas). Šias kokybės kontrolės procedūras reikia pakartoti kiekvienai naujai antikūno partijai arba pakeitus tyrimo parametrus. Tyrimo patikrai tinka krūties vėžinės ląstelės su žinoma HER2 būseną.

## DAŽYMO INTERPRETAVIMAS / TIKĖTINI REZULTATAI

Vykstant VENTANA automatinėi imuninio dažymo procedūrai nudažytas rudos spalvos (DAB) reakcijos gaminy susėda antigeno vietoje, lokalizuotose „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno. Kvalifikuotas patologas, kuris turi patirties atliekant imunohistochemines procedūras, prieš interpretuodamas rezultatus privalo įvertinti kontrolinius mėginius ir patvirtinti dažomo audinio atitiktį.

### Teigiamos kontrolės

Nudažyta teigiamą kontrolinį audinį pirmiausia reikia apžiūrėti, siekiant įsitikinti, kad visi reagentai veikia tinkamai. Tinkamos spalvos reakcijos gaminy tikslinių ląstelių membranoje rodo teigiamą reaktyvumą. Atsižvelgiant į inkubacijos trukmę ir naudojamo hematoksilino stiprumą, kontrastinis dažymas lemia šviesiai arba tamsiai mėlyną ląstelių branduolių spalvą. Pemelyg intensyvus arba nevisiškas kontrastinis dažymas gali trukdyti tinkamam rezultatų interpretavimui.

Jeigu teigiamuose kontroliniuose audiniuose nematomas teigiamas nusidažymas, visi tiriamų mėginių rezultatai turi būti laikomi negaliojančiais.

### Neigiamos audinio kontrolės

Neigiamas kontrolinis audinys turėtų būti ištriktas po teigiamo kontrolinio audinio, kad būtų patikrintas specifinis tikslinio antigeno žymėjimas pirminiu antikūnu. Nesant neigiamo kontrolinio audinio specifinio nusidažymo patvirtinama, kad ląstelėms ar ląstelių komponentams trūksta antikūnų kryžinio reaktyvumo. Jei audinys nudažytas kontrastiniais dažais, gali būti nudažyta ir už ląstelių ribų, t. y. tarpadininėse erdmėse. Jei specifinis nusidažymas stebimas neigiamame kontroliniame audinyje, paciento mėginio rezultatai turi būti laikomi negaliojančiais.

### Neigiamos reagento kontrolės

Esant nespecifiniam dažymui, jis bus išsklaidęs. Atsitiktinis silpnas jungiamojo audinio nusidažymas taip pat gali būti matomas audinių pjūviuose, kuriose yra per daug formalino. Dažymo rezultatams interpretuoti turėtų būti naudojamos nepažeistos ląstelės, nes nekrotinės arba išsigimusios ląstelės dažnai nusidažo nespecifiškai.

### Paciento audinys

Paciento mėginiai turėtų būti tiriami paskutiniai. Teigiamas dažymo intensyvumas turi būti įvertintas atsižvelgiant į bet kokį neigiamo reagento kontrolinio fono dažymą. Atliekant

imunohistocheminį tyrimą neigiamas rezultatas reiškia, jog tikslinis antigenas nebuvo aptiktas, bet ne tai, kad antigeno nebuvo tirtose ląstelėse arba audinyje. Interpretuojant bet kokį imunohistocheminį rezultatą, kiekvieno audinio mėginio morfologiją taip pat reikia iširti naudojant hematoksilinu ir eozinu nudažytą pjūvį. Kvalifikuotas patologas turi interpretuoti paciento morfologinius rezultatus, išvadas ir atitinkamus klinikinius duomenis.

Kvalifikuotas patologas, kuris turi patirties imunohistocheminėse procedūrose, prieš interpretuodamas rezultatus turi įvertinti teigiamą ir neigiamą kontrolines medžiagas bei kvalifikuoti nudažytą produktą.

## „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno interpretavimo vertinimo tvarka

Krūties karcinomos, kurioms nustatyta padidėjusi HER2 baltymo ekspresija, turi atitikti dažymo intensyvumo ribinės vertės (2+ arba daugiau skalėje nuo 0 iki 3+) ir procentiškai teigiamų navikinių ląstelių (daugiau kaip 10 %) kriterijus. Dažymą taip pat būtina lokalizuoti ląstelinėje membranoje. Citoplazminis dažymas gali vykti, tačiau jis nėra įtrauktas į teigiamumo nustatymą. Tinkamai išsilaikęs ir tinkamai nusidažęs audinio plotas turi būti ištriktas, siekiant nustatyti dažymo intensyvumą ir membranos nusidažymo aprėptį. Jei nudažyta vieta visiškai apsupa citoplazminę membraną, reikia nurodyti „2+“ arba „3+“ vertinimą. Dalinis membranos dažymas turi būti vertinamas „1+“. Ties kraštais gali reikėti padidinti 40 kartų arba daugiau, kad pavyktų atskirti „1+“ ir „2+“ intensyvumus. Priešingai 3+ intensyvumo atvejais, 2+ atvejais matomas ryškesnis ir aiškesnis žiedas, o 3+ atvejais matomas labai storas kontūras. Toliau pateikiama apibendrinta dažymo kriterijų schema. 5. lent. Daugiau informacijos su dažymo naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną nuotraukomis rasite „PATHWAY anti-HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody“ aiškinimo gairėse.

**5. lent.** Ląstelių membranos dažymo naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną intensyvumo ir tipo kriterijai.

Dažymo tipas	Balas (nurodyti gydančiam gydytojui)	HER2 dažymo vertinimas
Membranos dažymas nepastebėtas	0	Neigiamas
Neryškus, dalinis membranos dažymas bet kokia vėžinių ląstelių proporcija	1+	Neigiamas
Silpnas visos membranos dažymas, daugiau nei 10 % vėžinių ląstelių	2+	Silpnai teigiamas*
Stiprus visos membranos dažymas, daugiau nei 10 % vėžinių ląstelių	3+	Teigiamas

\* Rekomenduojamas refleksas ISH

## APRIBOJIMAI

### Bendrieji apribojimai

- Imunohistochemija yra kelių etapų diagnostikos procesas. Ją taikantys specialistai turi būti išmokyti, kaip pasirinkti tinkamus reagentus ir audinio pjūvius, fiksuoti, apdoroti ir paruošti imunohistochemijos objektinį stiklėlį bei interpretuoti dažymo rezultatus.
- Audinių nusidažymui įtakos turi audinio tvarkymo ir apdorojimo prieš dažymą metodai. Dėl netinkamo fiksavimo, šaldymo, atšildymo, plovimo, džiovavimo, kaitinimo, dalijimo ar užteršimo kitais audiniais ar skysčiais gali atsirasti artefaktų, gali įvykti antikūnų sulaikymas arba gali būti gauti klaidingai neigiami rezultatai. Nevienodi rezultatai gali būti gauti dėl skirtingų fiksavimo ir įterpimo metodų naudojimo arba dėl natūralaus audinio nevienodumo.
- Pemelyg intensyvus arba nevisiškas kontrastinis dažymas gali trukdyti tinkamam rezultatų interpretavimui.
- Bet kokio teigiamo nusidažymo arba jo nebuvo klinikinė interpretacija turėtų būti vertinama atsižvelgiant į paciento ligos istoriją ir kitus histopatologinius kriterijus. Kliniškai interpretuojant bet kokį dažymą ar jo nebuvimą papildomai reikia remtis morfologiniais tyrimais ir tinkamomis kontrolinėmis medžiagomis bei kitais diagnostiniais tyrimais. Kvalifikuotas patologas privalo susipažinti su antikūnais, reagentais ir metodais, naudojamais nudažytam preparatui interpretuoti. Dažymas

turi būti atliekamas sertifikuotoje ir licencijuotoje laboratorijoje prižiūrint patologui, kuris atsakingas už nudažytų objektyvių stiklelių peržiūrą ir teigiamų bei neigiamų kontrolinių medžiagų tinkamumo užtikrinimą.

- Rinkinyje esantys VENTANA antikūnai ir reagentai yra optimaliai atskiesti ir pritaikyti naudoti pagal pridėdamas instrukcijas. Dėl bet kokio nuokrypio nuo rekomenduojamos tyrimo procedūros gauti rezultatai gali būti neteisingi. Būtina naudoti ir dokumentuoti tinkamas kontrolines medžiagas. Naudotojai, kurie nesilaiko rekomenduojamų tyrimo procedūrų, privalo priimti atsakomybę už paciento rezultatų interpretavimą.
- Šis produktas nėra skirtas naudoti srauto citometrijoje, efektyvumo charakteristikos nebuvo nustatytos.
- Ankščiau netirtuose audiniuose gali pasireikšti nenumatytų reakcijų. Nenumatytų reakcijų tikimybė net ir tikrintų audinių grupėse negali būti visai atmetama dėl biologinio kintamumo antigenų ekspresijos neoplazmoje arba kitų patologinių audinių.<sup>24</sup> Kreipkitės į savo vietinį pagalbos tarnybos atstovą su dokumentuotomis nenumatytomis reakcijomis.
- Žmonių, užsikrėtusių hepatito B virusu ir turinčių hepatito B paviršiaus antigeną (HBsAg), audiniai gali nespecifiškai nusidažyti krienų peroksidaze.<sup>25</sup>
- Klaidingai teigiamus rezultatus galima gauti dėl neimunologinio baltymų arba substrato reakcijos gaminių jungimosi. Jas taip pat gali sukelti pseudoperoxidazės poveikis (eritrocitai), endogeninis peroksidazės aktyvumas (citochromas C) arba endogeninis biotinas (pavyzdžiui, kepenys, smegenys, krūtis, inkstas), tai priklauso nuo naudojamo imuninio dažo tipo.<sup>26</sup>
- Atliekant imunohistocheminį tyrimą neigiamas rezultatas reiškia, jog antigenų nebuvo aptikta, bet ne tai, kad antigenų nebuvo tirtose ląstelėse / audinyje.

#### SPECIFINIAI APRIBOJIMAI

Šis antikūnas optimizuotas taip, kaip nurodoma 1. lent. 2. lent ir 3. lent „BenchMark IHC/ISH“ prietaisams ir aptikimo chemijoms. Dėl audinių fiksavimo ir apdoravimo skirtumų gali reikėti padidinti arba sumažinti atskirų mėginių pirminio antikūno inkubavimo trukmę. Prireikus daugiau informacijos apie fiksavimo kintamuosius, žr. leidinį „Immunohistochemistry Principles and Advances“.<sup>21</sup>

Antikūnas, naudojamas kartu su VENTANA aptikimo rinkiniais ir priedais, aptinka antigeną, kuris išlieka po įprasto fiksavimo formaline, audinių apdoravimo ir padalijimo. Naudotojai, kurie nesilaiko rekomenduojamų tyrimo procedūrų, yra atsakingi už paciento rezultatų interpretavimą ir patvirtinimą.

Objektiniai stikleliai turėtų būti dažomi nedelsiant, nes audinio pjūvių antigeniškumas laikui bėgant gali sumažėti dėl aplinkos veiksnio ilgo sandėliavimo metu.

Ne visuose prietaisuose gali būti užregistruoti visi tyrimai. Dėl daugiau informacijos kreipkitės į vietinį „Roche“ atstovą.

#### EFEKTYVUMO CHARAKTERISTIKOS

##### ANALITINIS EFEKTYVUMAS

Buvo atlikti dažymo jautrumo, specifiškumo ir tikslumo tyrimai; rezultatai išvardyti toliau.

##### Jautrumas ir specifiškumas

„PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno jautrumas / specifiškumas nustatytas tyrimo metu, kuris neparodė jokio specifinio membranos dažymo daugeliui sveikų audinių. Dažymo rezultatai nurodomi 6. lent. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno jautrumas / specifiškumas taip pat nustatytas tyrimo metu, kuris neparodė jokio specifinio membranos dažymo daugelyje neoplastinių audinių. Dažymo rezultatai nurodomi 7. lent. Specifiškumui ir jautrumui nustatyti taikomas dažymas atliktas naudojant „VIEW DAB Detection Kit“ protokolą „BenchMark XT“ prietaise arba „ultraView“ protokolą „BenchMark ULTRA“ prietaise, nurodytame anksčiau.

Teigiamas tonzilės epitelio, stemplės epitelio, prostatos, periferinio nervo, priešskydinės liaukos, krūties vėžio, gaubtinės žarnos ir kiaušidžių vėžio dažymas atitinka duomenis publikuojamoje literatūroje, aprašančioje HER2 ekspresiją.

Jautrumas priklauso nuo antigeno konservavimo. Bet koks netinkamas audinių apdorojimas fiksavimo, dalijimo, įterpimo ar laikymo metu, keičiantis antigeniškumą, susilpnina HER2 baltymo aptikimą naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną ir gali sąlygoti klaidingai neigiamus rezultatus.

6. lent. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno jautrumas / specifiškumas buvo nustatytas tiriant FFPE sveikus audinius.

Audinys	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius	Audinys	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Smegenys	0/6	Plonoji žarna	0/6
Smegenėlės	0/6	Gaubtinė žarna	0/46
Antinksčiai	0/6	Kepenys	0/6
Kiaušidė	0/6	Seilių liauka	0/3
Kasa	0/6	Liežuvis	0/3
Limfmazgis	0/12	Inkstas	0/6
Hipofizė	0/5	Prostata	1/6
Sėklidė	0/6	Šlapimo pūslė <sup>b</sup>	3/3
Skydliaukė	0/6	Tiesioji žarna	0/6
Krūtis	0/14	Priešskydinė liauka <sup>c</sup>	4/6
Blužnis	0/6	Endometriumas	0/3
Tonzilė <sup>a</sup>	3/6	Gimda	0/3
Užkrūčio liauka	0/5	Gimdos kaklelis	0/5
Kaulų čiulpai	0/3	Gimdos kaklelio kanalas	0/1
Plautis	0/6	Skeletinis raumuo	0/6
Širdis	0/5	Oda	0/6
Perikardas	0/3	Nervas	2/6
Stemplė	1/6	Mezotelis	0/3
Skrandis	0/11		

<sup>a</sup> Židininis epitelio ląstelių paviršiaus dažymas

<sup>b</sup> Membraninis paviršinių urotelio ląstelių dažymas

<sup>c</sup> Židininis membranos dažymas

7. lent. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno jautrumas / specifiškumas buvo nustatytas ištyrus įvairius FFPE neoplastinius audinius.

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Glioblastoma (smegenų)	0/2
Meningioma (smegenų)	0/1
Oligodendroglioma (smegenų)	0/1
Serozinė adenokarcinoma (kiaušidžių)	0/2
Karcinoma, neapibrėžiama (NOS) (kiaušidžių)	1/2
Neuroendokrininė neoplazma (kasos)	0/1
Adenokarcinoma (kasos)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (kasos)	0/3
Seminoma (sėklidės)	0/1

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Embrioinė karcinoma (sėklidės)	0/1
Medulinė karcinoma (skydliaukės)	0/1
Papilinė karcinoma (skydliaukės)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (skydliaukės)	0/3
Mikroinvazinė duktalinė karcinoma (krūtis)	2/2
Invazinė duktalinė karcinoma (krūtis)	42/99
Karcinoma, neapibrėžiama (krūtis)	1/4
Smulkių ląstelių karcinoma (plaučių)	0/1
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (plaučių)	0/1
Adenokarcinoma (plaučių)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (plaučių)	0/2
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (stemplės)	0/1
Adenokarcinoma (stemplės)	0/1
Mucininė adenokarcinoma (skrandžio)	0/4
Adenokarcinoma (skrandžio)	8/88
Žiedinių ląstelių karcinoma (skrandžio)	0/4
Karcinoma, neapibrėžiama (skrandžio)	0/3
Adenokarcinoma (plonosios žarnos)	0/1
Virškinimo trakto stromos navikas (plonosios žarnos)	0/1
Adenokarcinoma (gaubtinės žarnos)	0/32
Virškinimo trakto stromos navikas (gaubtinės žarnos)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (gaubtinės žarnos)	1/3
Adenokarcinoma (tiesiosios žarnos)	1/5
Virškinimo trakto stromos navikas (tiesiosios žarnos)	0/1
Melanoma (tiesiosios žarnos)	0/1
Hepatoceliulinė karcinoma (kepenų)	0/3
Hepatoblastoma (kepenų)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (kepenų)	0/3
Šviesiųjų ląstelių karcinoma (inkstu)	0/1
Karcinoma, neapibrėžiama (inkstu)	0/5
Adenokarcinoma (prostatos)	0/2
Karcinoma, neapibrėžiama (prostatos)	0/3
Lejomioma (gimdos)	0/1
Adenokarcinoma (gimdos)	0/1
Šviesiųjų ląstelių karcinoma (gimdos)	0/1
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (gimdos kaklelio)	0/2

Patologija	Teigiamų atvejų skaičius / bendras atvejų skaičius
Embrioinė rhabdomyosarkoma (skersaruožio raumens)	0/1
Bazinių ląstelių karcinoma (odos)	0/1
Plokščiųjų ląstelių karcinoma (odos)	1/1
Neurofibroma (juosmens)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneumo)	0/1
Mezotelioma (pilvaplėvės)	0/1
Pleomorfinė rhabdomyosarkoma (pilvaplėvės)	0/1
Limfoma, neapibrėžiama	0/3
B ląstelių limfoma, neapibrėžiama (blužnies)	0/1
B ląstelių limfoma, neapibrėžiama (limfmazgio)	0/2
Hodžkino limfoma (limfmazgio)	0/1
Urotelio karcinoma (šlapimo pūslės)	1/1
Lejomiosarkoma (šlapimo pūslės)	0/1
Osteosarkoma (kaulo)	0/1
Lejomiosarkoma (lygiojo raumens)	0/1
Tiesiosios žarnos adenokarcinoma (metastazavusi)	0/1
Gaubtinės žarnos adenokarcinoma (metastazavusi)	0/7
Gaubtinės žarnos mucininė adenokarcinoma (metastazavusi)	0/1
Neuroendokrininė neoplazma, neapibrėžiama	0/2
Lejomioma	0/2
Melanoma	0/2
Sarkoma, neapibrėžiama	0/2
Nediferencijuota karcinoma, neapibrėžiama	0/1

## Pakartojamumas ir atkuriamumas

### Pakartojamumo ir tarpinio tikslumo tyrimai

Vienos serijos dažymo atkuriamumas „BenchMark XT“ prietaise buvo nustatytas nudažius tris objektinius stiklelius su penkiais krūtis vėžio audiniais, įvertintais 0, 1+, 2+ ir 3+ HER-2 ekspresijos balais. Kiekvienu atveju trys iš 3 objektinių stiklelių buvo tinkamai nudažyti serijos metu visuose tiriamuose prietaisuose. Naudotojai turėtų patikrinti tos pačios serijos atkuriamumo rezultatus vienoje serijoje nudažydami kelis nuoseklių pjūvių rinkinius su mažu, vidutiniu ir dideliu antigenų tankiais.

Skirtingų serijų ir platformų dažymo atkuriamumas buvo nustatytas trijų skirtingų prietaisų serijų metu „BenchMark XT“ prietaise nudažius tris objektinius stiklelius su penkiais krūtis vėžio audiniais, įvertintais 0, 1+, 2+ ir 3+ HER-2 ekspresijos balais. Kiekvienu atveju 9 iš 9 objektinių stiklelių buvo tinkamai nudažyti trijų prietaisų serijų metu visuose tiriamuose prietaisuose. Naudotojai turėtų patikrinti skirtingų serijų atkuriamumo rezultatus skirtingomis dienomis nudažydami kelis nuoseklių pjūvių rinkinius su mažu, vidutiniu ir dideliu antigenų tankiais.

### Atkuriamumas tarp skirtingų partijų

Atkuriamumas tarp skirtingų partijų buvo nustatytas automatiškai nudažius 5 krūties vėžio audinius, įvertintus 0, 1+, 2+ ir 3+ HER2 ekspresijos balais, su 3 „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno partijomis. Trys vertintojai nudažytus audinius vertino 0–3+ skalėje. Ištryrus 3 objektyvius stiklelius su 5 nudažytais audiniais, nustatyta 100 % atitiktis tarp partijų ir vertintojų.

### Tarplaboratorinio ir skirtingų vertintojų „BenchMark XT“ prietaiso rezultatų atkuriamumo tyrimai

„BenchMark XT“ prietaiso tarplaboratorinis dažymo ir skirtingų vertintojų vertinimo atkuriamumas: tarplaboratorinio atkuriamumo tyrime dalyvavo trys laboratorijos iš skirtingų Jungtinių Valstijų institucijų. 40 neutraliame buferiniame formaline fiksuotos invazinės krūties karcinomos atvejų pjūvių objektyvių stiklelių [10 iš kiekvienos HER-2 klasifikavimo kategorijos (0–1+, 2+, 3+)] ir šeši (6) „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ buvo išsiųsti į tyrimo vietas, kad juos galima būtų nudažyti „BenchMark XT“ prietaise naudojant rekomenduojamą dažymo protokolą. Kontrolės apėmė „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ ir antrą objektyvų stiklelių kiekvieno atvejo, nudažyto neigiamu I<sub>g</sub> reagentu. Atsižvelgiant į kontrolių efektyvumą, jokiose vietose nebuvo netinkamų serijų. Rezultatus išanalizavo „Ventana“. Trisdešimt keturių iš keturiasdešimties (34/40) objektyvių stiklelių dažymo vietose buvo panašus dažymo intensyvumas. Šeši mėginiai (6/40 arba 15 %) skyrėsi ne daugiau kaip 1 intensyvumo lygiu. Trijų (3/6) mėginių lygiai svyravo nuo 0 iki 1+ ir buvo laikomi neigiamais. Dviejų mėginių (2/40 arba 5 %) lygiai svyravo nuo 2+ iki 3+, o vieno mėginio (1/40) – nuo 1+ iki 2+. Visais 40 atvejų (100 %) mažiausiai 2 iš 3 patologų nuomonės sutapo.

### „BenchMark ULTRA“ prietaiso efektyvumo charakteristikos, naudojant „VIEW DAB Detection Kit“ ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“.

#### „BenchMark ULTRA“ prietaiso tarplaboratorinis dažymas ir atkuriamumas skirtingomis dienomis

Tarplaboratoriniame atkuriamumo tyrime dalyvavo trys laboratorijos iš skirtingų Jungtinių Valstijų institucijų. 48 FFPE invazinės krūties karcinomos atvejų pjūvių objektyviai stikleliai [12 iš kiekvienos HER-2 klasifikavimo kategorijos (0, 1+, 2+, 3+)] ir 1 „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ pora kiekvienam iš 12 dažymo serijų buvo pateiktos į tyrimo vietas dažymui „BenchMark ULTRA“ prietaisu, taikant rekomenduojamą dažymo protokolą ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“. Kontrolės apėmė „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ ir antrą objektyvų stiklelių kiekvieno atvejo, nudažyto neigiamu I<sub>g</sub> reagentu. Atvejo būsenos nežinantys patologai įvertino objektyvius stiklelius ir pateikė klinikinį vertinimą (t. y. 0, 1+, 2+, 3+). Rezultatus išanalizavo „Ventana“. Naudojant standartinę 2x2 lentelių nomenklaturą, teigiamos atitikties vidurkis (APA) tarp tyrimo vietų apskaičiuotas kaip  $2a/(2a+b+c)$ , o neigiamos atitikties vidurkis (ANA) apskaičiuotas kaip  $2d/(2d+b+c)$ . Visose tyrimo vietose skirtingų vietų APA, grindžiamas klinikiniu vertinimu (teigiamas, neigiamas), buvo 90.0 % (108/120), o ANA buvo 92.9 % (156/168). Lyginant vietų poras, APA apskaičiuotas kaip  $a/(a+c)$ , o ANA apskaičiuotas kaip  $d/(b+d)$ . Skirtingų vietų APA vertinimas atitinkamai buvo 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) ir 89.5 % (34/38) A ir B, A ir C bei B ir C vietoms. Skirtingų vietų ANA vertinimas atitinkamai buvo 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) ir 93.1 % (54/58) A ir B, A ir C bei B ir C vietoms.

Toliau esančios lentelės (8. lent. 9. lent ir 10. lent) yra 3x3 rezultatų pateiktis kiekvienam vertintojui, remiantis klinikiniu vertinimu, kur 2+ ir 3+ yra atskirti:

#### 8. lent. A ir B vietų tarplaboratorinės atitikties dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas „BenchMark ULTRA“ prietaise su „ultraView Universal DAB Detection Kit“.

A vieta	B vieta			Iš viso
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Iš viso	12	9	27	48
Bendra atitiktis procentais (OPA): n/N (%)				43/48 (89.6)

#### 9. lent. A ir C vietų tarplaboratorinės atitikties dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas „BenchMark ULTRA“ prietaise su „ultraView Universal DAB Detection Kit“.

A vieta	C vieta			Iš viso
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Iš viso	12	5	31	48
Bendra atitiktis procentais (OPA): n/N (%)				42/48 (87.5)

#### 10. lent. B ir C vietų tarplaboratorinės atitikties dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnas „BenchMark ULTRA“ prietaise su „ultraView Universal DAB Detection Kit“.

B vieta	C vieta			Iš viso
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Iš viso	12	5	31	48
Bendra atitiktis procentais (OPA): n/N (%)				44/48 (91.7)

#### „BenchMark ULTRA“ prietaiso dažymo atkuriamumas skirtingomis dienomis

Atkuriamumo skirtingomis dienomis (IDR) tyrimo dalis apėmė 12 atvejų su numatytu maždaug trijų (3) atvejų paskirstymu ties kiekvienu klinikiniu vertinimu (0, 1+, 2+, 3+). Per mažiausiai 20 dienų iš viso vyko penki tyrimai „BenchMark ULTRA“ prietaisu vienoje tyrimo vietoje (C tyrimo vietoje), vykdančioje IDR tyrimo dalį, kad dvi dažymo dienos nebūtų viena po kitos. IDR APA ir ANA vertinimai, pagrįsti klinikiniu „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo C vietoje vertinimu visomis dienomis, buvo 100 %. Bendros atitikties procentais dažniai (OPA) lyginant skirtingas dienas, remiantis klinikiniais vertinimais, buvo 100 % kiekvienai lyginamai dienai bei visoms dienoms kartu.

#### Tarplaboratorinio ir skirtingų vertintojų „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaiso rezultatų atkuriamumo tyrimai naudojant „ultraView Universal DAB Detection Kit“

Tarplaboratoriniame atkuriamumo tyrime dalyvavo trys laboratorijos iš skirtingų Jungtinių Valstijų institucijų. 28 FFPE invazinės krūties karcinomos atvejų pjūvių objektyviai stikleliai [7 iš kiekvienos HER2 klasifikavimo kategorijos (0, 1+, 2+, 3+)], „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide“ kontrolinių objektyvių stiklelių pora ir vienas kontrolinio krūties karcinomos audinio atvejis kiekvienai iš 10 dažymo serijų buvo pateikti į tyrimo vietas dažymui „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaisu, taikant rekomenduojamą dažymo protokolą ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“. Kontrolės apėmė „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“, kontrolinio krūties karcinomos audinio atvejį ir antrą objektyvų stiklelių iš kiekvieno tyrimo atvejo, nudažyto neigiamu I<sub>g</sub> reagentu. Atvejo būsenos nežinantys patologai įvertino objektyvius stiklelius ir pateikė klinikinį vertinimą (t. y. 0, 1+, 2+, 3+). Rezultatus išanalizavo „Ventana“.

HER2 būsenos (teigiamos arba neigiamos) atkuriamumas buvo įvertintas visiems vertinamiems atvejo objektyviams stikleliams, naudojant atvejo lygio modalinę HER2 būseną kaip kiekvieno atvejo etaloną. Apskaičiuojant atitikties dažnius, HER2 0 arba 1+ balas buvo laikomas neigiamu, o HER2 2+ arba 3+ balas buvo laikomas teigiamu. Modalinė HER2 būseną kiekvienu atveju buvo apibrėžta kaip dažniausiai vertintojo nustatomas konkretaus atvejo rezultatas (teigiamas arba neigiamas). Visi nustatyti rezultatai, gauti sujungus visų tyrimo vietų, vertintojų, dienų ir atvejų vertinamų objektyvių stiklelių populiacijos rezultatus, buvo lyginami su modalinės HER2 būsenos rezultatais. Jungtinės analizės PPA, NPA ir OPA atitinkamai buvo 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420) ir 97.7 % (821/840). HER2 būsenos atkuriamumas taip pat buvo įvertintas kaip APA, ANA ir OPA dažniai, atliekant visus galimus porinius palyginimus tarp skirtingų tyrimo vietų ir bendrai lyginant visas tyrimo vietas. Įvertinus atkuriamumą tarp skirtingų vietų, APA, ANA ir OPA atitinkamai buvo 95.9 %, 95.9 % ir 95.9 %. Įvertinus atkuriamumą tarp skirtingų



vertintojų, APA, ANA ir OPA rezultatai atitinkamai buvo 95.5 %, 95.5 % ir 95.5 %. Įvertinus atkuriamumą skirtingomis dienomis, APA, ANA ir OPA buvo 97.0 %, 97.0 % ir 97.0 %. Dvipusiai 95 % PI buvo apskaičiuoti taikant procentilio savirankos metodą.

Šie rezultatai pateikiami 11–14 lentelėse.

**11. lent.** Bendra atitiktis, lyginant HER2 būsena ir krūties karcinomos atvejų, nudažytų naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaise, atvejo lygio modalinę būsena.

HER2 būsena	„BenchMark ULTRA PLUS“ modalinė būsena		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Teigiamas	411	10	421
Neigiamas	9	410	419
Iš viso	420	420	840
	n/N	% (95 % PI)	
Teigiama atitiktis procentais	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Neigiama atitiktis procentais	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Bendra atitiktis procentais	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

**12. lent.** Bendra skirtingų vietų atitiktis, atliekant porinius palyginimus tarp krūties karcinomos atvejų, nudažytų naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaise, HER2 būsena.

HER2 būsena iš I vietos	HER2 būsena iš J vietos		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Teigiamas	4037	163	4200
Neigiamas	183	4017	4200
Iš viso	4220	4180	8400
	n/N	% (95 % PI)	
Teigiamos atitikties vidurkis	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Neigiamos atitikties vidurkis	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Bendra atitiktis procentais	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Pastaba. I ir J vietos – tai šiame tyrime naudotos vietos (A vieta, B vieta ir C vieta). Bendras atitikties dažnis apskaičiuojamas sujungiant visus galimus visų vietų (A ir B, A ir C, B ir C vietų) palyginimus.

**13. lent.** Bendra skirtingų vertintojų atitiktis, atliekant porinius palyginimus tarp krūties karcinomos atvejų, nudažytų naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaise, HER2 būsena.

HER2 būsena iš 1 vertintojo	HER2 būsena iš 2 vertintojo		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Teigiamas	201	9	210
Neigiamas	10	200	210
Iš viso	211	209	420
	n/N	% (95 % PI)	
Teigiamos atitikties vidurkis	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Neigiamos atitikties vidurkis	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Bendra atitiktis procentais	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Pastaba. I ir 2 vertintojai – tai vertintojai iš tos pačios tyrime naudotos vietos (A vietos, B vietos arba C vietos). Bendras atitikties dažnis apskaičiuojamas sujungiant atitinkančius vertintojų rezultatus iš visų tyrimo vietų.

**14. lent.** Bendra skirtingų dienų atitiktis, atliekant porinius palyginimus tarp krūties karcinomos atvejų, nudažytų naudojant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaise, HER2 būsena.

HER2 būsena iš I dienos	HER2 būsena iš J dienos		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Teigiamas	817	15	832
Neigiamas	35	813	848
Iš viso	852	828	1680
	n/N	% (95 % PI)	
Teigiamos atitikties vidurkis	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Neigiamos atitikties vidurkis	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Bendra atitiktis procentais	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Pastaba. I ir J dienos – tai tyrimo dažymo dienos (nuo 1 iki 5 dienos). Bendras atitikties dažnis apskaičiuojamas sujungiant visus galimus kiekvieno vertintojo iš kiekvienos vietos bet kurių dviejų dienų palyginimus.

#### „BenchMark ULTRA“ ir „BenchMark XT“ prietaisų palyginamasis tyrimas

Platformos palyginamajame tyrime dalyvavo dvi dažymo laboratorijos ir trys vertinimo vietos Jungtinėse Valstijose. 280 FFPE invazinės krūties karcinomos atvejų pjūvių objekciniai stikleliai [maždaug 70 atvejų iš kiekvienos HER2 klasifikavimo kategorijos (0, 1+, 2+, 3+)] buvo atsitiktiniu būdu padalintos dviem dažymo vietoms (140 atvejų kiekvienai vietai) dažymui „BenchMark XT“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisais, taikant rekomenduojamus dažymo protokolus ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“. Kontrolės apėmė „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides“ ir antrą objekcinį stiklelį iš kiekvieno atvejo, nudažyto neigiamu Ig reagentu. Nudažyti atvejai iš 1 ir 2 vietos buvo padalinti į keturis objekcinį stiklelių rinkinius bei po vieną rinkinį vienu metu pateikti trims skirtingiems kvalifikuotiems vertintojams (patologams); vienas vertintojas 1 vietoje, vienas vertintojas 2 vietoje ir vienas vertintojas 3 vietoje. Atvejo būsena ir dažymo platformos nežinantys patologai įvertino visus keturis objekcinį stiklelių rinkinius bei kiekvienam atvejui pateikė klinikinį vertinimą (t. y. 0, 1+, 2+, 3+). Rezultatus išanalizavo „Ventana“ PPA vertinimui (ir apatinė dvipusio 95 % pasikliautojo intervalo riba) „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymui „BenchMark ULTRA“ prietaise ir „BenchMark XT“ prietaise, remiantis teigiamu ir neigiamu klinikinio vertinimu buvo 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) ir 94.9 % (89.3) atitinkamai A, B ir C vertintojams. NPA vertinimai (ir apatinė dvipusio 95 % pasikliautojo intervalo riba) „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymui „BenchMark ULTRA“ prietaise ir „BenchMark XT“ prietaise, remiantis teigiamu ir neigiamu klinikinio vertinimu buvo 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) ir 99.3 % (96.3) atitinkamai A, B ir C vertintojams. OPA tarp „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo „BenchMark ULTRA“ ir „BenchMark XT“ prietaisais, remiantis 2x2 teigiamo ir neigiamo klinikinio vertinimo analize, buvo 91.8 %, 92.5 % ir 97.4 % atitinkamai A, B ir C vertintojams. Skirtingų platformų atitikties dažnio iš kiekvieno vertintojo 3x3 pateiktis, remiantis klinikinio vertinimu (0/1+, 2+, 3+), pateikiama 15. lent. 16. lent ir 17. lent.

**15. lent.** „BenchMark ULTRA“ ir „BenchMark XT“ prietaisų skirtingų platformų atitikties dažnių 3x3 analizė – A vertintojas.

„BenchMark ULTRA“ prietaisas	„BenchMark XT“ prietaisas			Iš viso
A vertintojas	3+	2+	0, 1+	
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Iš viso	96	47	124	267
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			226/267 (84.6) (79.8-88.5)	



**16. lent.** „BenchMark ULTRA“ ir „BenchMark XT“ prietaisų skirtingų platformų atitiktis dažnių 3x3 analizė – B vertintojas.

„BenchMark ULTRA“ prietaisas	„BenchMark XT“ prietaisas			
B vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Iš viso	69	68	130	267
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			242/267 (90.6) (86.5-93.6)	

**17. lent.** „BenchMark ULTRA“ ir „BenchMark XT“ prietaisų skirtingų platformų atitiktis dažnių 3x3 analizė – C vertintojas.

„BenchMark ULTRA“ prietaisas	„BenchMark XT“ prietaisas			
C vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Iš viso	66	52	149	267
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			257/267 (96.3) (93.2-98.0)	

### „BenchMark ULTRA PLUS“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisų palyginamasis tyrimas

„BenchMark ULTRA PLUS“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisais gautų rezultatų atitiktis tyrime dalyvavo trys laboratorijos iš skirtingų Jungtinių Valstijų institucijų. „Ventana“ nudažė 122 FFPE invazinės krūties karcinomos atvejų pjūvių objektyvius stiklelius iš kiekvienos HER-2 klasifikavimo kategorijos (0, 1+, 2+, 3+) „BenchMark ULTRA“ prietaise, naudodama rekomenduojamą dažymo protokolą ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“. Kontrolės apėmė vieną „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide“ ir vieną teigiamo kontrolinio krūties karcinomos audinio atvejį vienai dažymo serijai. Be to, antras kiekvieno tyrimo atvejo objektyvus stiklis buvo nudažytas neigiamu Ig reagentu. Tų pačių atvejų pjūvių objektyviai stikleliai buvo suskirstyti atsitiktinės atrankos būdu ir vienodai paskirstyti (40–41 atvejais vienai vietai) visoms tyrimo vietoms, kad juos galima būtų nudažyti „BenchMark ULTRA PLUS“ prietaise naudojant rekomenduojamą dažymo protokolą ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“. Kontrolės apėmė vieną „PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide“ ir vieną teigiamo kontrolinio krūties karcinomos audinio atvejį vienai dažymo serijai. Be to, antras kiekvieno tyrimo atvejo objektyvus stiklis buvo nudažytas neigiamu Ig reagentu. Atvejo būsenos nežinantys patologai įvertino viename „BenchMark IHC/ISH“ prietaise nudažytus objektyvius stiklelius ir pateikė klinikinį vertinimą (t. y. 0, 1+, 2+, 3+). Po 2 savaičių pasišalinimo laikotarpio patologai įvertino antrame „BenchMark IHC/ISH“ prietaise nudažytus objektyvius stiklelius. Rezultatus išanalizavo „Ventana“. HER2 IHC 0+ arba 1+ balas buvo laikomas neigiamu, o HER2 IHC 2+ arba 3+ balas buvo laikomas teigiamu. OPA, PPA ir NPA dažniai atitinkamai buvo 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) ir 89.1 % (179/201). Dvipusiai 95 % PI buvo apskaičiuoti taikant procentilio savirankos metodą. Visų atvejų fono ir morfologijos priimtumo dažniai naudojant abu prietaisus buvo 100 %. Šie rezultatai pateikiami 18 lentelėje.

**18. lent.** Bendra atitiktis, lyginant krūties karcinomos atvejų, nudažytų naudojant „anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA PLUS“ ir „BenchMark ULTRA“ prietaisuose, HER2 būseną

„BenchMark ULTRA PLUS“ HER2 būseną	„BenchMark ULTRA“ HER2 būseną		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Teigiamas	154	22	176
Neigiamas	11	179	190
Iš viso	165	201	366
	n/N	% (95 % PI)	
Teigiama atitiktis procentais	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Neigiama atitiktis procentais	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Bendra atitiktis procentais	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

### Platformų palyginamųjų tyrimų mėginių skirtingų patologų atkuriamumas

Teigiamos ir neigiamos atitiktis dažniai su dvipusio vertinimo 95 % pasikliautinaisiais intervalais buvo apskaičiuoti šešioms galimiems poriniams palyginimams tarp kiekvienos platformos vertintojų.

„BenchMark ULTRA“ prietaiso atveju PPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) ir 83.5 % (111/133). NPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) ir 98.5 % (132/134). Aukščiausi OPA vertinimai buvo iš A ir B vertintojų (91.8 %), o žemiausi iš B ir C vertintojų (91.0 %) bei A ir C vertintojų (88.8 %).

„BenchMark XT“ prietaiso atveju PPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) ir 84.7 % (116/137). NPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) ir 98.5 % (128/130). Aukščiausi OPA vertinimai buvo iš A ir B vertintojų (92.5 %), o žemiausi iš B ir C vertintojų (91.4 %) bei A ir C vertintojų (89.1 %).

### „VIEW DAB Detection Kit“ ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“ palyginamasis tyrimas

1 tyrimo vietas 140 FFPE invazinės krūties karcinomos atvejų kohorta [maždaug 35 atvejai iš kiekvienos HER-2 klasifikavimo kategorijos (0, 1+, 2+, 3+)] buvo naudojama „VIEW DAB Detection Kit“ ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“ palyginamajame tyrime, dažant „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūną „BenchMark ULTRA“ prietaise. Aptikimo palyginamajame tyrime dalyvavo viena dažymo laboratorija ir trys vertinimo vietas Jungtinėse Valstijose. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymui „BenchMark ULTRA“ prietaise PPA vertinimai tarp rezultatų, gautų naudojant „VIEW DAB Detection Kit“ ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“ metodus, pagrįstus klinikinio vertinimo (teigiamas, neigiamas) buvo 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) ir 96.5 % (55/57) atitinkamai A, B ir C vertintojams, o NPA vertinimai tarp aptikimo metodų buvo 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) ir 97.5 % (77/79) atitinkamai A, B ir C vertintojams. OPA vertinimai tarp aptikimo rinkiųjų buvo 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) ir 97.1 % (132/136) atitinkamai A, B ir C vertintojams. Palyginamojo aptikimo atitiktis dažnių iš kiekvieno vertintojo 3x3 pateiktis, remiantis klinikinio vertinimo (0/1+, 2+, 3+), pateikiama 19. lent, 20. lent ir 21. lent.

**19. lent.** A vertintojas, „VIEW DAB Detection Kit“ ir „*ultraView* Universal DAB Detection Kit“ atitiktis dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY HER2 (4B5)“ antikūno dažymas „BenchMark ULTRA“ prietaise.

VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
A vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
A vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
0, 1+	0	3	59	62
Iš viso	46	25	65	136
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			119/136 (87.5) (80.9-92.0)	

20. lent. B vertintojas, „VIEW DAB Detection Kit“ ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“ atitiktis dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymas „BenchMark ULTRA“ prietaise.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
B vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Iš viso	33	32	71	136
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			128/136 (94.1) (88.8-97.0)	

21. lent. C vertintojas, „VIEW DAB Detection Kit“ ir „ultraView Universal DAB Detection Kit“ atitiktis dažnių 3x3 analizė – „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymas „BenchMark ULTRA“ prietaise.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
C vertintojas	3+	2+	0, 1+	Iš viso
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Iš viso	32	25	79	136
Bendra atitiktis procentais: n/N (%) (95 % PI)			132/136 (97.1) (92.7-98.9)	

### Aptikimo palyginamųjų tyrimų mėginių skirtingų patologų atkuriamumas

Teigiamos ir neigiamos atitiktis dažniai su dvipusio vertinimo 95 % pasikliautiniais intervalais buvo apskaičiuoti šešiams galimiems poriniams palyginimams tarp kiekvieno metodo vertintojų.

„VIEW DAB Detection Kit“ prietaiso atveju PPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) ir 79.7 % (55/69). NPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) ir 97.0 % (65/67). Aukščiausi bendros atitiktis vertinimai buvo iš A ir B vertintojų (96.3 %), o žemiausi iš A ir C vertintojų (86.0 %) bei B ir C vertintojų (88.2 %).

„ultraView Universal DAB Detection Kit“ prietaiso atveju PPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) ir 86.2 % (56/65). NPA vertinimai iš A ir B, A ir C, B ir C, B ir A, C ir A bei C ir B vertintojų atitinkamai buvo 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) ir 98.6 % (70/71). Bendros atitiktis dažniai kiekvienai vertintojų porai buvo panašūs: 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) ir 92.6 % (126/136) atitinkamai A ir B vertintojams, A ir C vertintojams bei B ir C vertintojams.

### KLINIKINIS VEIKSMINGUMAS

#### „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno ir „PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody“ palyginamieji tyrimai

Siekiant iširti „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno rezultatų koreliaciją su „PATHWAY anti-HER2 (CB11)“ antikūno ir „PathVysion HER2 FISH“ (abu anksčiau patvirtinti FDA diagnostiniais tyrimais) rezultatais, atliktas metodo palyginimas. Tyrime dalyvavo šeši tyrėjai. Trys skirtingų tyrėjų grupės įvertino dvi atskiras kohortas (1 kohorta: n = 144, 2 kohorta: n = 178), naudodamos žinomus krūties vėžio atvejus, nudažytus HER2 CB11 ir HER2 4B5. FISH duomenys gauti iš paciento istorijos. Pagal trijų vertintojų antikūnų tyrimo rezultatus kiekvienam atvejui apskaičiuotas konsensuso balas, kad sumažėtų vertintojo kintamumas, esantis HER2 vertinimo atveju.<sup>27,28,29</sup> Iš viso įvertinti 322 atvejai. „PATHWAY anti-HER2 (CB11)“ antikūnu nudažyti objekciniai stikliai apdoroti ir nudažyti pagal gamintojo nurodymus, pateiktus CB11 antikūno metodo lape. Tarp dažymo ir CB11 antikūnu nudažytų objektnių stiklių nuskaitymo buvo vidutiniškai vienu metų tarpas. Kadangi vieno iš šių vertintojų balai buvo už pasikliautinio intervalo ribų, duomenys iš dviejų kohortų pateikiami toliau nurodytu būdu.

Palyginamųjų tyrimų mėginių skirtingų patologų atkuriamumas

22. lent. 1 kohorta – trijų patologų konsensuso IHC balai.

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

1 kohorta: efektyvumo charakteristikos 3 x 3 pateikčiai.

Bendra atitiktis yra  $(29+13+53)/143 = 66.4\%$  (95 % PI = 38.6 %, 59.7 %).

1 kohorta: efektyvumo charakteristikos 2 x 2 pateikčiai (HER2 antikūno teigiami (2+ ir 3+) ir neigiami (0+ ir 1+) balai apjungiami).

- Teigiamas atitiktis procentais yra  $(29+2+24+13)/(31+37) = 100\%$  (95 % PI % = 97.5 %–100 %).
- Neigiamas atitiktis procentais  $53/75 = 70.7\%$  (95 % PI = 58.5 %–80.1 %).
- Bendra atitiktis yra  $(29+24+2+13+53)/143 = 84.7\%$  (95 % PI = 78.2 %–90.0 %).

23. lent. 2 kohorta – trijų patologų konsensuso IHC balai.

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

2 kohorta: efektyvumo charakteristikos 3 x 3 pateikčiai.

Bendra atitiktis yra  $(72+12+80)/178 = 92.1\%$  (95 % PI = 80.1 %, 93.1 %).

2 kohorta: efektyvumo charakteristikos 2 x 2 pateikčiai (HER2 antikūno teigiami (2+ ir 3+) ir neigiami (0+ ir 1+) balai apjungiami).

- Teigiamas atitiktis procentais yra  $(72+12+1+1)/(73+20) = 92.5\%$  (95 % PI = 85.2 %–96.9 %).
- Neigiamas atitiktis procentais  $80/85 = 94.1\%$  (95 % PI = 86.8 %–98.1 %).
- Bendra atitiktis yra  $(72+12+1+1+80)/178 = 93.3\%$  (95 % PI = 88.5 %–96.4 %).

24. lent. 1 kohorta – konsensuso CB11 IHC balai iš trijų patologų, palyginti su FISH.

CB11 balas	FISH rezultatas		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Iš viso	86	58	144

1 kohorta: CB11 ir FISH efektyvumo charakteristikos, 2 x 2 pateiktis (kur 2 ir 3 balai yra laikomi teigiamais).

- Teigiama atitiktis procentais yra  $(32+32)/86 = 74.4\%$  (95 % PI = 63.8 %–83.2 %).
- Neigiama atitiktis procentais 53/58 = 91.4 % (95 % PI = 80.9 %–97.1 %).
- Bendra atitiktis yra  $(32+32+53)/144 = 81.2\%$  (95 % PI = 73.9 %–87.2 %).

25. lent. 1 kohorta – konsensuso 4B5 IHC balai iš trijų patologų, palyginti su FISH.

4B5 balas	FISH rezultatas		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Iš viso	86	58	144

1 kohorta: 4B5 ir FISH efektyvumo charakteristikos, 2 x 2 pateiktis (kur 2 ir 3 balai yra laikomi teigiamais).

- Teigiama atitiktis procentais yra  $(55+25)/86 = 93.0\%$  (95 % PI = 87.9 %–96.3 %).
- Neigiama atitiktis procentais 47/58 = 81.0 % (95 % PI = 73.4 %–86.0 %).
- Bendra atitiktis yra  $(55+25+47)/144 = 88.2\%$  (95 % PI = 82.1 %–92.2 %).

26. lent. 2 kohorta – konsensuso CB11 IHC balai iš trijų patologų, palyginti su FISH.

CB11 balas	FISH rezultatas		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Iš viso	93	85	178

2 kohorta: CB11 ir FISH efektyvumo charakteristikos, 2 x 2 pateiktis (kur 2 ir 3 balai yra laikomi teigiamais).

- Teigiama atitiktis procentais yra  $(72+13)/93 = 91.3\%$  (95 % PI = 85.0 %–96.7 %).
- Neigiama atitiktis procentais 77/85 = 90.6 % (95 % PI = 83.9 %–96.3 %).
- Bendra atitiktis yra  $(72+13+77)/178 = 91.0\%$  (95 % PI = 86.5 %–94.9 %).

27. lent. 2 kohorta – konsensuso 4B5 IHC balai iš trijų patologų, palyginti su FISH.

4B5 balas	FISH rezultatas		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87

4B5 balas	FISH rezultatas		Iš viso
	Teigiamas	Neigiamas	
Iš viso	93	85	178

2 kohorta: 4B5 ir FISH efektyvumo charakteristikos, 2 x 2 pateiktis (kur 2 ir 3 balai yra laikomi teigiamais).

- Teigiama atitiktis procentais yra  $(72+11)/93 = 89.2\%$  (95 % PI = 82.5 %–95.1 %)
- Neigiama atitiktis procentais 77/85 = 90.6 % (95 % PI = 84.0 %–96.4 %)
- Bendra atitiktis yra  $(72+11+77)/178 = 90.0\%$  (95 % PI = 85.4 %–93.6 %)

Palyginamųjų tyrimų mėginių skirtingų patologų atkuriamumas

Skirtingų patologų nuomonės apie IHC objektinius stiklelius gali skirtis, todėl kiekvieną iš dviejų kohortų analizavo trys patologai (iš viso 6 patologai), kad galima būtų nuskaityti visus mėginius. Galutiniam rezultatui nustatyti buvo naudojama du iš trijų taisyklė. Toliau pateikiama iš trijų patologų gautų palyginamojo mėginių iš kiekvienos kohortos tyrimo rezultatų santrauka (1 kohorta: n = 178, 2 kohorta: n = 144).

28. lent. 1 kohorta: 4B5 vertinimas iš trijų patologų.

HER2 balas	4B5 balas		
	1 tyrėjas	2 tyrėjas	3 tyrėjas
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0, 1+	80	89	87
Iš viso	174	178	178

Pastaba. Trijų patologų vertinami iš viso 3 mėginiai skyrėsi daugiau nei vienu lygiu (t. y. 0, 2+).

1 mėginys: vienas patologas įvertino 2+, du patologai įvertino 0+.

2 mėginys: vienas patologas įvertino 0+, du patologai įvertino 2+.

3 mėginys: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 1+, o trečias įvertino 2+.

29. lent. 1 kohorta: CB11 vertinimas iš trijų patologų.

HER2 balas	CB11 balas		
	1 tyrėjas	2 tyrėjas	3 tyrėjas
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0, 1+	80	81	87
Iš viso	174	178	178

Pastaba. Trijų patologų vertinami iš viso 1 mėginiai skyrėsi daugiau nei vienu lygiu (t. y. 1–3+).

1 mėginys: vienas patologas įvertino 1+, antras patologas įvertino 2+, o trečias įvertino 3+.

30. lent. 2 kohorta: 4B5 vertinimas iš trijų patologų.

HER2 balas	4B5 balas		
	4 tyrėjas	5 tyrėjas	6 tyrėjas
3+	59	65	50
2+	30	28	39
0, 1+	52	51	55

HER2 balas	4B5 balas		
	4 tyrėjas	5 tyrėjas	6 tyrėjas
<b>Iš viso</b>	141	144	144
<p>Pastaba. Trijų patologų vertinami iš viso 6 mėginiai skyrėsi daugiau nei vienu lygiu (pvz. 0, 3+).</p> <p>1 mėginys: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 0+, o trečias įvertino 2+.</p> <p>2 mėginys: vienas patologas įvertino 1+, antras patologas įvertino 1+, o trečias įvertino 3+.</p> <p>3 mėginys: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 2+, o trečias patologas įvertino 2+.</p> <p>4 ir 5 mėginiai: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 2+, o trečias įvertino 2+.</p> <p>6 mėginys: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 3+, o trečias įvertino 3+.</p>			

**31. lent. 2 kohorta: CB11 vertinimas iš trijų patologų.**

HER2 balas	CB11 balas		
	4 tyrėjas	5 tyrėjas	6 tyrėjas
<b>3+</b>	31	37	28
<b>2+</b>	38	32	47
<b>0,1+</b>	75	75	69
<b>Iš viso</b>	144	144	144
<p>Pastaba. Trijų patologų vertinami iš viso 8 mėginiai skyrėsi daugiau nei vienu lygiu (t. y. 0–2+).</p> <p>1–6 mėginiai: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 1+, o trečias įvertino 2+.</p> <p>7 ir 8 mėginiai: vienas patologas įvertino 0+, antras patologas įvertino 2+, o trečias įvertino 2+.</p>			

Toliau pateikiama procentinės atitikties intervalų tarp patologų porų lentelė (trys poros kiekvienai kohortai).

**32. lent. 2X2\* atitikčių intervalai trims patologams.**

	Bendra atitiktis procentais	Teigiama atitiktis procentais	Neigiama atitiktis procentais
<b>4B5 ir CB11</b>			
1 kohorta	82.6–86.9 %	97.3–100.0 %	68.0–75.4 %
2 kohorta	88.2–95.5 %	87.6–95.6 %	86.1–95.4 %
<b>4B5 ir FISH</b>			
1 kohorta	86.8–88.2 %	90.7–94.2 %	79.3–81.0 %
2 kohorta	87.4–89.9 %	88.2–90.0 %	84.5–91.8 %
<b>CB11 ir FISH</b>			
1 kohorta	79.9–84.0 %	73.3–80.2 %	89.7–89.7 %
2 kohorta	84.8–93.3 %	86.7–92.5 %	82.7–94.1 %

\* 0, 1+ = neigiamas. 2+ ir 3+ = teigiamas

**Tyrimo klinikinė išvada – KATHERINE**

„PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno ir „INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail“ („INFORM HER2 Dual ISH“ tyrimo) efektyvumas buvo iširtas atlikus KATHERINE (BO27938), atsitiktinės atrankos, daugiacentrį, atvirą III etapo tyrimą, skirtą įvertinti

trastuzumabo emtanžą (KADCYLA) ir trastuzumabo efektyvumą bei saugumą, naudojant kaip papildomą priemonę pacientams su HER2 teigiama pirminio krūties vėžio diagnoze, kuriems po priešoperacinio gydymo likęs navikas patologiškai yra krūtyje arba pažasties limfmazgiuose (NCT01772472).

Pacientų mėginiai buvo nudažyti „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu ir (arba) „INFORM HER2 Dual ISH“ tyrimu bei buvo įvertintas jų dažymo priimtumas ir HER2 būsena. Daugelis mėginių buvo surinkti iki gydymo biopsijos metu (80.9 %), surinkti kaip biopsiniai (75.3 %) arba taikant chirurginius metodus (24.3 %). Daugiau mėginių priklausė duktaliniam neoplastiniam potipiui (95.4 %), o daugelis buvo gauti ne iš metastazinių mėginių (96.2 %).

33. lent. aprašomas bendras dažymo priimtumo dažnis „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnui tarp diagnozuoti numatytos populiacijos (ITD) subjekto lygmenyje. Iš 1788 subjektų „PATHWAY ITD Population“, 55 nepavyko iš pirmo karto atlikti dažymo „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu. Šiems subjektams dažymą kartojant, visi buvo nudažyti sėkmingai, išskyrus keturis. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno pirminio ir galutinio bendro dažymo priimtumo dažniai atitinkamai buvo 96.9 % ir 99.8 %. Taip pat nurodomi foninio dažymo priimtumo ir morfologijos priimtumo „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūnu nudažytiems objektiniams stikleliams vertinimai. „ITD Population“ pirminio ir galutinio fono dažymo priimtumo dažniai atitinkamai buvo 99.6 % ir 99.9 %. Pirminio ir morfologijos priimtumo dažniai atitinkamai buvo 99.2 % ir 99.9 %.

**33. lent. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ antikūno dažymo efektyvumo charakteristikos.**

Požymis	Priimtumo dažnis % (n/N) (95 % PI)	
	Pirminis *	Galutinis **
Bendras dažymo priimtumo dažnis	96.9 (1733/1788) (96.0, 97.6)	99.8 (1784/1788) (99.4, 99.9)
Fonas	99.6 (1768/1775) (99.2, 99.8)	99.9 (1786/1787) (99.7, 100.0)
Morfologija	99.2 (1762/1776) (98.7, 99.5)	99.9 (1787/1788) (99.7, 100.0)

\* Pirminis dažymo bandymas yra pirmasis subjekto dažymo bandymas

\*\* Galutinis dažymo bandymas yra įtraukimo į tyrimą BO27938 sprendimui priimti naudotas dažymo bandymas

KATHERINE apėmė 1486 pacientus su HER2 teigiamu, ankstyvos stadijos krūties vėžiu ir liekamuoju invaziniu naviku krūtyje ir (arba) pažasties limfmazgiuose po gydymo taksanu ir trastuzumabu, kurie prieš įtraukimą į tyrimą buvo neoadjuvantinio režimo dalis. Taikant tyrimo numatytą gydymą pagal lokalias rekomendacijas pacientams taip pat buvo skiriama radioterapija ir (arba) hormonų terapija. Krūties naviko mėginiai padidėjusią HER2 ekspresiją turėjo parodyti kaip 3+ IHC arba ISH amplifikacijos santykį  $\geq 2.0$ , nustatyta centrinėje laboratorijoje. Pacientai, kuriems skiriamas trastuzumabas arba KADCYLA, buvo atrinkti atsitiktinai (1:1). Atsitiktinė atranka buvo padalinta pagal klininius etapus, hormonų receptorių būseną, prieš operaciją skirtą į HER2 nukreiptą gydymą (trastuzumabu, trastuzumabu ir papildomai į HER2 nukreiptomis priemonėmis (-ėmis)) bei pagal patologinę mazgo būseną, įvertintą po priešoperacinio gydymo.

KADCYLA skirtas į veną po 3.6 mg/kg 1-ą dieną iš 21 dienos ciklo. Trastuzumabas skirtas į veną po 6 mg/kg 1-ą dieną iš 21 dienos ciklo. KADCYLA arba trastuzumabu pacientai buvo gydomi iš viso 14 ciklų, nebent liga kartojosi, buvo atšauktas sutikimas arba pasireiškė nepriimtinas toksiškumas (atsižvelgiant į tai, kas pasireiškė anksčiau). Pirminės analizės metu vidutinė gydymo trukmė buvo 10 mėnesių (intervalas: 1–12) su KADCYLA, o vidutinė gydymo trukmė su trastuzumabu buvo 10 mėnesių (intervalas: 1–13). KADCYLA vartojimą nutraukę pacientai tyrimo metu numatytą gydymą galėjo baigti iki 14 į HER2 nukreipto gydymo ciklų su trastuzumabu, jei tai buvo tinkama pagal toksiškumo vertinimus bei nusprendus tyrėjui.

Pagrindinė KATHERINE tyrimo efektyvumo vertinamoji baigtis buvo išgyvenamumas po invazinės ligos (IDFS). IDFS apibrėžiamas kaip laikas nuo atsitiktinės atrankos pradžios iki pirmo ipsilateralinio invazinio krūties naviko pasikartojimo, ipsilateralinio vietinio arba regioninio invazinio krūties vėžio pasikartojimo, tolimo pasikartojimo, kontralateralinio invazinio krūties vėžys atsiradimo arba mirties dėl bet kokios priežasties.

Pacientų demografijos ir pradinio naviko charakteristikos buvo subalansuotos visose gydymo grupėse. Vidutinis amžius buvo maždaug 49 metai (23–80 metų), 72.8 % buvo baltaodžiai, 8.7 % buvo azijiečiai ir 2.7 % buvo juodaodžiai arba afroamerikiečiai. Visi pacientai, išskyrus 5, buvo moterys. 22.5 procentai buvo įtraukti Šiaurės Amerikoje, 54.2 % Europoje ir 23.3 % likusiose šalyse. Tyrimo grupėse naviko prognostinės



charakteristikos, įskaitant hormonų receptorių būseną (teigiamas: 72.3 %, neigiamas: 27.7 %), klinikinį etapą pateikimo metu (neoperuojamas: 25.3 %, operuojamas: 74.8 %) ir pataloginę mazgo būseną po priešoperacinio gydymo (mazgas teigiamas: 46.4 %, mazgas neigiamas nevertintas: 53.6 %), buvo panašios.

Didžiąją dalį pacientų (76.9 %) skirtas neoadjuvantinės chemoterapijos su antraciklinu režimas. Kaip neoadjuvantinio gydymo dalį 19.5 % pacientų gavo į HER2 nukreiptą priemonę kartu su trastuzumabu. Pertuzumabas buvo antras pasirinkimas 93.8 % pacientų, kurie gavo antrą neoadjuvantinę į HER2 nukreiptą priemonę.

Klinikiniu požiūriu prasmingas ir statistiškai reikšmingas IDFS pagerėjimas pastebėtas pacientams, kurių krūties vėžio mėginiai „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ tyrimo metu buvo identifikuoti kaip HER2 teigiami ir kurie gavo trastuzumabo emtanziną (KADCYLA), o ne trastuzumabą („Herceptin“) (HR = 0.43, 95 % CI [0.32, 0.58]), o tai atitinka 57 % IDFS atvejų rizikos mažėjimą. IHC teigiamo pogrupio efektyvumo rezultatai pateikiami 34. lent ir 2 paveikslėlyje.

Duomenų analizė taip pat rodo, kad tyrimo populiacijai koreguojant diferenciacinį mėginių ėmimą arba jo nekoreguojant dėl vietinės išankstinės patikros, vaisto efektyvumo vertinimai yra panašūs.

**34. lent.** KATHERINE efektyvumo rezultatai IHC teigiamam pogrupiui.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumabas N = 559
<i>Pirminė vertinamoji baigtis</i>	<b>Išgyvenamumas po invazinės ligos (IDFS) <sup>1</sup></b>	
Pacientų su atvejais skaičius (%)	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [95 % PI]	0.43 [0.32, 0.58]	
3 metų be atvejų vertinimas <sup>2</sup> %	89.0	75.7

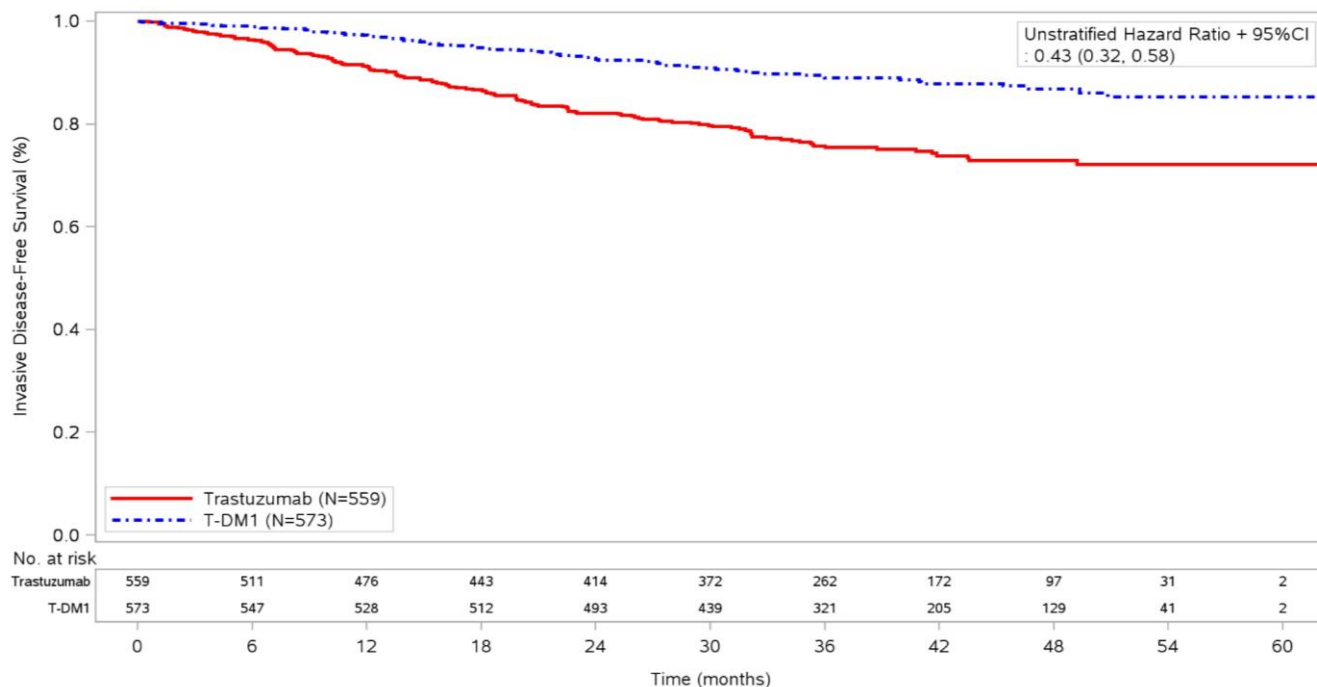
1. Duomenys iš pirmos tarpinės analizės

2. 3 metų be atvejų vertinimas, gautas iš „Kaplan-Meier“ vertinimų

KATHERINE tyrimo duomenys rodo, kad adjuvantinis trastuzumabo emtanzinas (KADCYLA) pademonstravo aiškų gydymo naudą lyginant su adjuvantiniu trastuzumabu („Herceptin“) pacientams su HER2 teigiamu ankstyvos stadijos krūties vėžiu ir liekamąja liga po neoadjuvantinio gydymo. „PATHWAY anti-HER2 (4B5)“ ir „INFORM HER2 Dual ISH“ tyrimai praverčia identifikuojant tuos pacientus, kuriems gydymas trastuzumabo emtanzinu (KADCYLA) galėtų būti naudingas.

## TRIKČIŲ DIAGNOSTIKA

1. Jei teigiama kontrolinė medžiaga nusidažo silpniau nei tikėtasi, reikia patikrinti kitas teigiamas kontrolines medžiagas, naudotas toje pačioje prietaiso serijoje, siekiant nustatyti, ar taip yra dėl pirminio antikūno ar vieno iš bendrųjų antrinių reagentų.
2. Jei teigiama kontrolinė medžiaga neigiama, reikia patikrinti, ar objektinio stiklelio brūkšninio kodo etiketė yra tinkama. Jei objektinis stiklelis tinkamai pažymėtas, reikia patikrinti kitas teigiamas kontrolines medžiagas, naudotas toje pačioje prietaiso serijoje, siekiant nustatyti, ar taip yra dėl pirminio antikūno ar vieno iš bendrųjų antrinių reagentų. Audiniai galėjo būti netinkamai surinkti, fiksuoti arba deparafinuoti. Būtina tinkamai atlikti paėmimo, laikymo ir fiksavimo procedūras.
3. Jei nebuvo pašalintas visas parafinas, objektai gali nenusidažyti. Reikia pakartoti deparafinavimo procedūrą.
4. Jei specifinis antikūnų dažymas yra per intensyvus, seriją reikia pakartoti sutrumpinant pirminio antikūno inkubacijos laiką 4 minučių intervalais, kol bus pasiektas norimas dažymo intensyvumas.
5. Jei audinio pjūviai nusiplauna nuo objektyvinių stiklelių, reikia patikrinti, ar objektyvinių stiklelių krūvis yra teigiamas.
6. Informacijos apie taisomuosius veiksmus žr. skyriuje „Nuosekli procedūra“, prietaiso naudotojo vadove arba kreipkitės į vietinį pagalbos tarnybos atstovą.



2. pav. „Kaplan-Meier“ išgyvenamumo po invazinės ligos kreivė KATHERINE. (T-DM1: trastuzumabo emtanzinas (KADCYLA))

## ŠALTINIAI

- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232:1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumour cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J*. 1987;6:605-610.
- 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.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Keatings L, Sinclair J, Wright C, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17:234-247.
- 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](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.
- Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69:57-58.
- 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.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansin for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-628.
- DePotter CR, Van Daele S, Van De Vijver MJ, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- 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.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
- 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66:194-199.
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1980;73:626-32.

26. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
27. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
28. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
29. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

**PASTABA.** Šiame dokumente dešimtainės trupmenos visada skiriamos tašku. Jis atskiria sveikąją dešimtainio skaičiaus dalį nuo trupmeninės dalies. Tūkstančių skirtukai nenaudojami.

Saugos ir veiksmingumo santrauką galima rasti čia:

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

#### SIMBOLIAI

Be ISO 15223-1 standarte pateiktų simbolių ir ženklų (JAV naudojamų simbolių aprašymai pateikti [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com)), „Ventana“ taip pat naudoja toliau nurodytus simbolius ir ženklus.



Pasaulinės prekybos identifikacinis numeris



Unikalus prietaiso atpažinties numeris



Nurodo subjektą, importuojantį medicinos prietaisą į Europos Sąjungą

#### INTELEKTINĖ NUOSAVYBĖ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* ir VENTANA logotipas yra „Roche“ prekių ženklai. Visi prekių ženklai yra atitinkamų jų savininkų nuosavybė.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

#### KONTAKTINĖ INFORMACIJA



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

[www.roche.com](http://www.roche.com)



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

