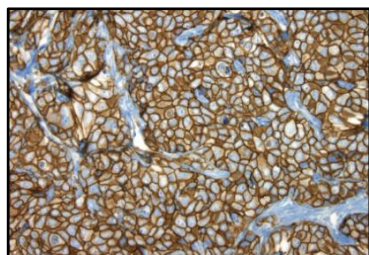


PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF

790-2991

05278368001

IVD
 50


Obrázok 1. Farbenie protilátky PATHWAY HER2 (4B5) pri karcinóme prsníka.

URČENÉ POUŽITIE

PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5)) od spoločnosti Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) je králičia monoklonálna protilátka určená na laboratórne použitie na semikvantitatívnu detekciu HER2 antigénu v rezoch formalinom fixovaného, v parafine zaliatého normálneho a neoplastického tkaniva po farbení na prístroji BenchMark IHC/ISH. Je indikovaná ako pomôcka

pri hodnotení pacientov s rakovinou prsníka, u ktorých sa zvažuje liečba liekom Herceptin® (trastuzumab) príp. KADCYLA® (ado-trastuzumab emtanzin).

Tento produkt má interpretovať kvalifikovaný patológ v spojení s histologickým vyšetrením, relevantnými klinickými informáciami a správnymi kontrolami.

Táto protilátka je určená na diagnostické použitie in vitro (IVD).

Poznámka: Všetci pacienti v klinických štúdiách zahŕňajúcich Herceptin boli vybraní na základe analýzy klinickej štúdie. Žiadny z pacientov v týchto štúdiách nebol vybraný na základe PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5). PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) bol porovnávaný s PATHWAY HER-2 (clone CB11) Primary Antibody na nezávislom súbore vzoriek a zistilo sa, že poskytuje prijateľne zhodné výsledky. Reálna korelácia klinického výsledku PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) nebola stanovená.

SÚHRN A VYSVETLENIE

PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5)) je králičia monoklonálna protilátka určená proti internej doméne transmembránového ľudského receptora epidermálneho rastového faktora 2 (HER2). HER2 naklonoval a charakterizoval Akiyama a kol. v roku 1986.¹ Preukázalo sa, že klon 4B5 reaguje s proteínom 185 kD z SK-BR-3 bunkových lyzátov cez Western blotting. SK-BR-3 je bunková línia karcinómu prsníka, ktorá vykazuje 128-násobnú nadmernú expresiu HER2 mRNA.² Veľkosť identifikovaného pásu úzko koreluje s veľkosťou hlásenou Akiyamom a kol. v prípade proteínu HER2 (185 kD).¹ Imunohistochemické (IHC) experimenty s transfekovanými bunkovými líniami (HEK293) preukázali, že klon 4B5 farbí bunky transfekované s HER2 a bunky transfekované s HER4. Nebolo pozorované žiadne farbenie buniek transfekovaných s HER1 alebo HER3. Údaje pre Western blot s rekombinantným HER4 proteínom tiež signalizovali, že klon 4B5 rozpoznáva epitop HER4.

HER2 je približne 185 kDa transmembránová receptorová tyrozínkináza, ktorá je štrukturálne podobná receptoru epidermálneho rastového faktora (EGFR).^{3,4} Génová amplifikácia a zodpovedajúca nadmerná expresia HER2 bola zistená v rôznych nádoroch vrátane karcinómu prsníka.^{3,4,5} Nadmerná expresia proteínov v dôsledku amplifikácie génu HER2, je primárnou hnacou silou tumorigenézy, ktorú sprostredkúva HER2.³ Nadmerná expresia HER2 proteínu na bunkovej membráne zvyšuje signálnu transdukciiu, ktorá upreguluje proliferáciu a diferenciáciu a v konečnom dôsledku spôsobuje tvorbu nádoru.^{3,4}

15 až 30 percent invazívnych duktálnych karcinómov prsníka je pozitívnych na nadmernú expresiu HER2 proteínu a/alebo amplifikáciu génu.^{6,7} Takmer všetky prípady Pagetovej choroby prsníka a až 90 percent prípadov duktálneho karcinómu in situ komedózneho typu je pozitívnych.^{6,8}

KLINICKÝ VÝZNAM

Rakovina prsníka je najčastejším karcinómom vyskytujúcim sa u žien a druhou najčastejšou príčinou úmrtí súvisiacich s rakovinou.^{4,6} V Severnej Amerike je pravdepodobnosť, že žena dostane rakovinu prsníka, jedna k ôsmim.⁴ Včasná detekcia a vhodné liečebné postupy môžu významne ovplyvniť mieru celkového prežitia.^{9,10} Malé vzorky tkaniva možno ľahko použiť pri rutinnej IHC, vďaka čomu je táto technika v kombinácii s protilátkami, ktoré detegujú antigény dôležité pre interpretáciu karcinómu, účinným nástrojom pre patológov pri diagnostike a prognostike ochorenia. Jedným z dôležitých markerov rakoviny prsníka v súčasnosti je HER2.¹¹⁻¹⁴

Terapeutické lieky Herceptin (trastuzumab) a KADCYLA (ado-trastuzumab emtanzin/trastuzumab emtanzin) sa ukázali byť prínosom pri niektorých pacientoch s karcinómom prsníka tým, že zastavujú a v niektorých prípadoch dokážu zvrátiť šírenie rakoviny.^{9,14} Tieto lieky sú humanizované monoklonálne protilátky, ktoré sa viažu na HER2 proteín na rakovinových bunkách.^{11,13,14} Iba pacienti s HER2 pozitívnymi karcinómami prsníka by mali benefitovať z liečby liekom Herceptin alebo KADCYLA.¹¹⁻¹⁴ In vitro diagnostika na vyhodnotenie stavu génu HER2 pri karcinómoch prsníka je dôležitá, pretože pomáha lekárovi pri určovaní terapie liekom Herceptin alebo KADCYLA.^{11,12,14} Detekcia založená na IHC expresie HER2 proteínu sa používa ako pomôcka pri hodnotení pacientov s rakovinou prsníka, u ktorých sa zvažuje nasadenie liečby liekom Herceptin alebo KADCYLA.

Interpretácia výsledkov akéhokoľvek detekčného systému pre HER2 musí brať do úvahy skutočnosť, že HER2 sa exprimuje v nádoroch rakoviny prsníka aj v zdravom tkanive, aj keď na rôznych úrovniach a s rôznymi vzormi expresie.¹⁵ Histologické tkanivové preparáty majú výhodu intaktnej morfológie tkaniva, čo pomáha pri interpretácii HER2 pozitivity vzorky. Všetky histologické testy musí interpretovať špecialista na morfológiu rakoviny prsníka a/alebo patológia, a výsledky sa musia doplniť morfológickými štúdiami a riadnymi kontrolami a používať v spojení s inými klinickými a laboratórnymi údajmi.

PRINCÍP POSTUPU

PATHWAY anti-HER2 (4B5) je králičia monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na HER2 v tkanivových rezoch fixovaných formalinom, zaliatých v parafine (FFPE). Špecifickú protilátku možno lokalizovať buď pomocou formulácie sekundárnej protilátky konjugovanej s biotínom, ktorá rozpoznáva králičie imunoglobulíny, po ktorej nasleduje pridanie konjugátu (HRP) streptavidín-chenovej peroxidázy (VIEW DAB Detection Kit), alebo sekundárnej protilátky konjugovanej HRP (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). Špecifický komplex protilátky a enzýmu sa potom vizualizuje s produktom zrážania enzýmovej reakcie. Každý krok sa inkubuje v priebehu presného času a pri presnej teplote. Na konci každého inkubačného kroku prístroj premyje rezy, aby sa zastavila reakcia a odstránil nenaviazaný materiál, ktorý by zabránil požadovanej reakcii v nasledujúcich krokoch. Prístroj aplikuje tekuté krycie skličko Liquid Coverslip, ktoré minimalizuje odparovanie vodných reagentov zo sklička so vzorkou.

Klinické prípady sa majú hodnotiť v kontexte výkonnosti príslušných kontrol. Odporúča sa zahrnúť pozitívne kontroly tkaniva fixovanej a spracovanej rovnakým spôsobom ako vzorka pacienta (napríklad slabé pozitívny karcinóm prsníka). Okrem farbenia pomocou protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) sa má druhé skličko farbiť s negatívnou kontrolou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby sa test považoval za platný, musí pozitívne kontrolné tkanivo vykázať membránové farbenie nádorových buniek. Tieto komponenty majú byť pri farbení s CONFIRM Negative Control Rabbit Ig negatívne. Okrem toho sa odporúča, aby sa s negatívne kontrolné tkanivo (napr. HER2-negatívny karcinóm prsníka) zaradilo pre každú dávku vzoriek, ktoré sa spracúvajú a analyzujú v prístroji BenchMark IHC/ISH. Negatívne kontrolné tkanivo je potrebné farbiť protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) s cieľom zabezpečiť, že zvýšenie antigénu a iné postupy predbežného ošetrovania nevytvoria falošne pozitívne farbenie. Použitie spoločnosťou VENTANA vopred zriedenej protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a detekčných súprav VIEW DAB a *ultraView* Universal DAB Detection na priame použitie v kombinácii s prístrojom BenchMark IHC/ISH znižuje pravdepodobnosť ľudskej chyby a inherentnej variability vyplývajúcej z individuálneho riedenia činidla, manuálneho pipetovania a manuálnej aplikácie činidla.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) obsahuje dostatok činidla na 50 testov.

Jeden 5 mL dávkovač protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) obsahuje približne 30 µg králičej monoklonálnej protilátky zameranej proti antigénu ľudského HER2.

Táto protilátka sa riedi v 0.05 solnom roztoku pufrovanom M Tris, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 a 0.3 % proteínovom nosiči a 0.05 % azide sodnom, ktorý je konzervačnou látkou. Obsahuje stopy telacieho fetálneho séra, približne 0.25 %, pochádzajúceho zo základného roztoku.

Koncentrácia špecifickej protilátky je približne 6 µg/mL.

Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) je králičí IgG zriedený zo supernatantov tkanivových kultúr.

Podrobné informácie o postupoch nájdete v príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA: Princíp postupu, Materiál a metódy, Získavanie a príprava vzoriek na analýzu, Postupy kontroly kvality, Riešenie problémov, Interpretácia výsledkov a Obmedzenia.

POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

Farbiace reagenty, napr. detekčné súpravy VENTANA, a pomocné komponenty vrátane sklíčok na negatívnu a pozitívnu kontrolu tkaniva nie sú súčasťou dodávky.

Nie všetky produkty uvedené v metodickom liste musia byť dostupné vo všetkých regiónoch. Obráťte sa na miestneho zástupcu podpory.

Nasledujúce reagenty a materiály môžu byť potrebné na farbenie, nie sú však súčasťou dodávky:

1. Odporúčané kontrolné tkanivo
2. Mikroskopické sklíčka, Superfrost Plus (VWR kat. č. 48311-703 alebo ekvivalent)
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. č. 760-1029 / 05266238001)
4. iVIEW DAB Detection Kit (kat. č. 760-091 / 05266157001)
5. ultraView Universal DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
14. Permanentné montážne médium
15. Krycie sklíčko
16. Automat na krycie sklíčka
17. Univerzálne laboratórne vybavenie
18. Prístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVANIE A STABILITA

Po prijatí a vtedy, keď sa nepoužíva, skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte.

Po každom použití je nutné opätovne nasadiť uzáver dávkovača a dávkovač umiestniť hneď do chladničky vo vertikálnej polohe, aby ste zaistili správnu dodávku reagentie a stabilitu protilátky.

Na každom dávkovači protilátky je uvedený dátum expirácie. Ak sa reagentia správne skladuje, zachováva svoje vlastnosti až do dátumu uvedeného na štítku. Nepoužívajte činidlo po dátume expirácie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Bežne spracované FFPE tkanivá sú vhodné na použitie s touto primárnou protilátkou, ak sa použijú spolu s detekčnými súpravami VENTANA a prístrojom BenchMark IHC/ISH. Sklíčka sa majú farbiť ihneď, keďže s postupom času môže dochádzať k poklesu antigénnosti tkanivových rezov. Odporúčané činidlo na fixáciu tkaniva je 10 % neutrálny pufrovaný formalín.¹⁶ Používa sa množstvo, ktoré je 15- až 20-násobkom objemu tkaniva. Žiadny fixatív neprenikne v priebehu 24 hodín viac ako 2 až 3 mm do pevného tkaniva alebo 5 mm do pórovitého tkaniva. Rez tkaniva v hrúbke 3 mm a menej sa má fixovať najmenej 4 hodiny a najviac 8 hodín. Fixáciu možno vykonať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).¹⁶

Správne fixované a zaliate tkanivá exprimujúce antigén zostanú stabilné aspoň 2 roky, ak sa skladujú v chlade (15 – 25 °C). Zákon o zdokonalení klinických laboratórií The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) z roku 1988, 42CFR493.1259 (b) požaduje, aby „laboratórium uchovávalo farbené sklíčka najmenej desať rokov od dátumu vyšetrenia a bloky vzoriek najmenej dva roky od dátumu vyšetrenia.“

Majú sa odrezať a na sklíčka zachytiť rezy v hrúbke približne 5 µm. Sklíčka majú byť Superfrost Plus alebo ekvivalentné. Tkanivo by sa malo vysušiť na vzduchu umiestnením sklíčok pri teplote okolia cez noc.¹⁷ Štúdie spoločnosti Ventana naznačujú, že rezy tkaniva a bunkových línií sušené na vzduchu a skladované pri teplote 2 – 8 °C sú stabilné až 6 mesiacov. Každé laboratórium má validovať stabilitu rezaných sklíčok pre svoje vlastné postupy a podmienky skladovania v prostredí.

Odporúčame spracovať pozitívnu a negatívnu kontrolu súčasne s neznámymi vzorkami.

VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

1. Určené na diagnostické použitie in vitro (IVD).
2. Určené len pre odborníkov.
3. **UPOZORNENIE:** V Spojených štátoch amerických federálny zákon povoľuje predaj tejto pomôcky iba prostredníctvom alebo na objednávku lekára. (Rx Only)
4. **Nepoužívajte po vykonaní stanoveného počtu testov.**
5. Kladne nabitie sklíčka môžu byť citlivé na vplyvy okolitého prostredia, čo vedie k nevhodnému farbeniu. O ďalšie informácie o tom, ako používať tieto typy sklíčok, požiadajte zástupcu spoločnosti Roche.
6. S materiálmi ľudského alebo živočíšneho pôvodu je potrebné zaobchádzať ako s biologicky nebezpečným materiálom a ich likvidácia musí zahŕňať náležité bezpečnostné opatrenia. V prípade expozície je potrebné dodržiavať zdravotné pokyny zodpovedných orgánov.^{18,19}
7. Zabráňte kontaktu reagentov s očami a sliznicami. Ak sa reagenty dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, zmyte ich veľkým množstvom vody.
8. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii reagentov, pretože to môže spôsobiť nesprávne výsledky.
9. Ak sa tento produkt používa podľa pokynov, nie je klasifikovaný ako nebezpečná látka. Konzervačná látka v reagentii je azid sodný. K príznakom nadmerného vystavenia pôsobeniu azidu sodného patrí podráždenie pokožky a očí, podráždenie slizníc a horných dýchacích ciest. Koncentrácia azidu sodného v tomto produkte je 0.05 % a nespĺňa kritériá pre nebezpečné látky. Nánosy NaN₃ môžu reagovať s oloveným alebo medeným potrubím a vytvárať vysoko výbušné azidy kovov. Pri likvidácii opláchnite veľkým množstvom vody, aby ste zabránili hromadeniu azidu sodného v potrubí.²⁰ U citlivých osôb môže dôjsť k systémovým alergickým reakciám.
10. Ďalšie informácie o používaní tohto zariadenia nájdete v používateľskej príručke k prístroju BenchMark IHC/ISH a v návodoch na použitie všetkých potrebných komponentov na stránke dialog.roche.com.
11. Informácie o spôsobe likvidácie získate od miestnych a/alebo štátnych orgánov.
12. Označenie bezpečnosti produktov v prvom rade zodpovedá usmerneniu GHS EÚ. Na požiadanie možno profesionálnemu používateľovi poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.
13. Pri hlásení podozrenia na závažné incidenty spojené s touto pomôckou sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche a kompetentný orgán členského štátu alebo krajiny, v ktorej má používateľ sídlo.

POSTUP FARBENIA

Primárne protilátky VENTANA boli vyvinuté na použitie v prístrojoch BenchMark IHC/ISH v kombinácii s detekčnými súpravami VENTANA a príslušenstvom. Odporúčané protokoly farbenia uvádzajú tabuľky nižšie. Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) je schválená na použitie v Spojených štátoch s uplatnením postupu farbenia PATHWAY pre odporúčané protokoly farbenia.

Táto protilátka je optimalizovaná na uvedené časy inkubácie, ale používateľ musí výsledky získané pomocou tejto reagentie overiť. Protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) by sa mala pred použitím nechať odstáť aspoň 30 minút pri izbovej teplote.

Parametre automatizovaných postupov sa môžu zobrazíť, tlačiť a editovať podľa postupu uvedeného v používateľskej príručke k prístroju. Podrobné informácie o postupoch IHC farbenia nájdete v príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA.

Ďalšie podrobnosti o správnom používaní tejto pomôcky nájdete v metodickom liste inline dávkovača spojenom s P/N 790-2991.

Tabuľka 1. Odporúčaný protokol farbenia pre protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekčnou súpravou iVIEW DAB Detection Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metóda		
	BenchMark	XT	ULTRA
Sušenie	Žiadne	Žiadne	Žiadne
Odstránenie parafínu	Zvolené	Zvolené	Zvolené
Úprava buniek (Odmaskovanie antigénu)	CC1, Štandard	CC1, Štandard	ULTRA CC1, mierna

Typ postupu	Metóda		
	BenchMark	XT	ULTRA
Protílátka (primárna)	32 minút, 37 °C	32 minút, 37 °C	24 minút, 36 °C
A/B Blocking (Biotin Blocking)	Vyžaduje sa		
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty		
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty		

Tabuľka 2. Odporúčaný protokol farbenia pre protílátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekčnou súpravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH s použitím protokolu farbenia PATHWAY.

Typ postupu	Metóda	
	XT	ULTRA alebo ULTRA PLUS
Postup farbenia:	XT <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5	U <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5
Odstránenie parafínu	Zvolené	Zvolené
Úprava buniek (Odmaskovanie antigénu)	CC1, mierna	ULTRA CC1, mierna
Enzým (proteáza)	Nevyžaduje sa	Nevyžaduje sa
Protílátka (primárna)	16 minút, 37 °C	12 minút, 36 °C
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty	
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty	

Tabuľka 3. Odporúčaný protokol farbenia pre protílátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) s detekčnou súpravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit na prístrojoch BenchMark IHC/ISH s použitím protokolu farbenia *ultraView*.

Typ postupu	Metóda	
	XT	ULTRA alebo ULTRA PLUS
Postup farbenia:	XT <i>ultraView</i> v3	U <i>ultraView</i> DAB
Odstránenie parafínu	Zvolené	Zvolené
Úprava buniek (Odmaskovanie antigénu)	Cell Conditioning 1, mierna	ULTRA CC1, mierna
Enzým (proteáza)	Nevyžaduje sa	Nevyžaduje sa
Protílátka (primárna)	16 minút, 37 °C	12 minút, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Zvolené	Zvolené
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty	
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty	

Vzhľadom na variáciu vo fixácii a spracovaní tkaniva a všeobecné laboratórne prístroje a podmienky prostredia môže byť nutné zvýšiť alebo znížiť inkubáciu primárnych protílátok, úpravu buniek alebo predúpravu proteáz na základe individuálnych vzoriek, použitej detekcie a preferencie čitateľa. Ďalšie informácie o premenných fixácie uvádza „Immunohistochemistry Principles and Advances.“²¹

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Optimálna laboratórna prax má zahŕňať pozitívny kontrolný rez na tom istom sklíčku, ako je testované tkanivo. Táto prax pomáha identifikovať pochybenia pri nanášaní reagentii na sklíčko. Na kontrolu kvality je najvhodnejšie tkanivo so slabým pozitívnym farbením. Kontrolné tkanivo môže obsahovať pozitívne alebo negatívne sa farbiace prvky a môže slúžiť ako tkanivo na pozitívnu aj negatívnu kontrolu. Kontrolné tkanivo musí byť nová autopsia, biopsia alebo chirurgická vzorka pripravená či zafixovaná čo najskôr rovnakým spôsobom ako testované rezy.

Známe pozitívne kontroly tkaniva sa majú používať len na sledovanie funkcie reagentii a prístrojov, nie ako pomôcka pri stanovení konkrétnej diagnózy testovacích vzoriek. Ak pozitívne kontroly tkaniva nepreukážu pozitívne farbenie, výsledky testovacej vzorky treba považovať za neplatné.

Prikladmi pozitívneho kontrolného tkaniva pre túto protílátku sú tkanivá slabého pozitívneho karcinómu prsníka.

Systémové kontroly bunkovej línie

Spoločnosť Ventana má k dispozícii ako samostatný produkt štyri kontroly bunkovej línie fixované formalínom a zaliate v parafíne, narezané a umiestnené na jedno nabitú sklíčku (P/N 781-2991). Sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides môžu byť užitočné na predbežnú validáciu metódy spracovania používanej na farbenie sklíčok s protílátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Tieto štyri kontroly bunkových línií sa vyznačujú in situ hybridizáciou pre počet génových kópií, Tabuľka 4. Pri správnom spracovaní a farbení by sa bunkové línie mali zafarbiť tak, ako je opísané v metodickom liste kontrolného sklíčka PATHWAY Her-2 4 in 1 Control Slide. Ak uvedené farbenie nie je zrejme v príslušných blokoch, najmä v kontrolách 1+ a 2+, farbenie tkanív by sa malo zopakovať.

Tabuľka 4. Charakteristika kontrolných sklíčok PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

IHC hodnotenie HER2	Bunková línia	Pomer HER2/Chr17 *
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* Pomer HER2/Chr17 predstavuje priemer troch šarží sklíčok PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides určených pomocou fluorescenčnej hybridizácie in situ (FISH)

Pozitívna kontrola tkaniva

Pozitívne kontrolné tkanivo fixované a spracované rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta sa musí použiť pre každú súpravu testovacích podmienok a pri každom realizovanom postupe farbenia protílátky PATHWAY anti-HER2 (4B5). Takéto tkanivo môže súčasne obsahovať pozitívne sa sfarbujuce bunky/komponenty tkaniva a negatívne sa sfarbujuce bunky/komponenty tkaniva a môže slúžiť ako pozitívne aj negatívne kontrolné tkanivo. Kontrolné tkanivo musí byť nová autopsia/biopsia/chirurgická vzorka pripravená a fixovaná čo najskôr rovnakým spôsobom ako testované rezy. Takéto tkanivo môže monitorovať všetky kroky analýzy od prípravy tkaniva po farbenie. Použitie tkanivového rezu fixovaného alebo spracovaného odlišne od testovacej vzorky zabezpečuje kontrolu všetkých reagentii a krokov metódy okrem fixácie a prípravy tkaniva. Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je vhodnejšie na optimálnu kontrolu kvality a detekciu malej degradácie reagencie ako tkanivo so silným pozitívnym farbením. V ideálnom prípade by sa malo vybrať tkanivo, o ktorom je známe, že má slabé, ale pozitívne farbenie, aby sa zabezpečila citlivosť systému na malú degradáciu činidla alebo problémy s metodikou IHC. Vo všeobecnosti však neoplastické tkanivo, ktoré je pozitívne na HER2, je silne pozitívne vzhľadom na povahu patológie (nadmerná expresia). Prikladom pozitívnej kontroly pre protílátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) je známy na HER2 slabého pozitívneho invazívneho karcinómu prsníka (napríklad duktálny alebo lobulárny). Pozitívne sa sfarbujuce komponenty tkaniva (membrána neoplastických buniek) sa používajú na potvrdenie toho, že bola protílátka aplikovaná a prístroj fungoval správne. Známe na HER2 slabého pozitívneho invazívneho karcinómu prsníka môže obsahovať pozitívne aj negatívne farbiace bunky alebo tkanivové komponenty a môže slúžiť ako pozitívne aj negatívne kontrolné tkanivo.

Známe pozitívne kontroly tkaniva je potrebné používať iba na monitorovanie správnej účinnosti spracovaných tkanív a testovacích reagentii, a nie ako pomôcku na určenie konkrétnej diagnózy zo vzoriek pacientov.

Negatívna kontrola tkaniva

Rovnaké tkanivové skúmanko, ktoré bolo použité pre pozitívnu kontrolu tkaniva (duktálny alebo lobulárny invazívny karcinóm prsníka), môže byť použité ako tkanivo na negatívnu kontrolu. Nefarbiace zložky (okolitá strôma, lymfoidné bunky a krvné cievy) by mali vykazovať neprítomnosť špecifického zafarbenia a mali by poskytovať indikáciu špecifického zafarbenia pozadia s primárnou protilátkou. Pri každom cykle farbenia použite tkanivo, o ktorom je známe, že je fixované, spracované a zaliate rovnakým spôsobom ako vzorka pacienta, aby sa overila špecifickosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a aby sa poskytol údaj o špecifickom farbení pozadia (falošne pozitívne farbenie).

Negatívna kontrolná reagentia

Spolu s každou vzorkou sa má analyzovať aj negatívna kontrolná reagentia, čo slúži ako pomôcka pri interpretácii výsledkov. Negatívna kontrolná reagentia sa používa na mieste primárnej protilátky pri hodnotení nešpecifického farbenia. Skúmanko by sa malo farbiť pomocou negatívnej kontroly CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubačná doba negatívnej kontrolnej reagentie sa musí rovnať inkubačnej dobe primárnej protilátky.

Nevysvetlené rozpory

Nevysvetlené rozpory pri kontrolách je potrebné okamžite oznámiť miestnemu zástupcovi podpory. Ak výsledky kontroly kvality nespĺňajú špecifikácie, výsledky pacientov sú neplatné. Pozrite si časť Riešenie problémov. Zistite a opravte problém, potom zopakujte postup so vzorkami pacientov.

Overenie analýzy

Pred počiatčným použitím protilátky alebo systému farbenia pri diagnostickom postupe je potrebné overiť špecifickosť protilátky jej otestovaním na sérii tkanív so známou charakteristikou imunohistochemického výkonu, ktorý predstavuje známe pozitívne a negatívne tkanivá (pozri Postupy kontroly kvality, ktoré boli odporúčané v tejto časti príbalového letáku a odporúčania Kontroly kvality programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²² alebo usmernenie CLSI Approved Guideline²³ alebo oba dokumenty). Tieto postupy kontroly kvality je potrebné zopakovať pri každej novej šarži protilátky, prípadne ak dôjde k zmene parametrov analýzy. Tkanivá rakoviny prsníka so známym stavom HER2 sú vhodné na overenie analýzy.

INTERPRETÁCIA FARBenIA / OČAKÁVANÉ VÝSLEDKY

Automatizovaný postup imunofarbenia VENTANA spôsobuje zrazenie do hneď zafarbeného reakčného produktu (DAB) v miestach antigénu lokalizovaných protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5). Skôr než sa budú výsledky interpretovať, musí kvalifikovaný patológ so skúsenosťami s imunohistochemickými postupmi vyhodnotiť kontroly a kvalifikovať farbený produkt.

Pozitívne kontroly

Najprv je potrebné preskúmať farbené pozitívne kontroly tkaniva s cieľom zaistiť, že všetky reagentie fungujú správne. Prítomnosť správne farbeného produktu reakcie v membráne cieľových buniek signalizuje pozitívnu reaktivitu. V závislosti od inkubačného času a účinku použitého hematoxylinu spôsobí kontrastné farbenie bledomodré až tmavomodré farbenie bunkových jadier. Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť interpretáciu výsledkov.

Ak pozitívna kontrola tkaniva neprekáže pozitívne farbenie, výsledky testovacích vzoriek treba považovať za neplatné.

Negatívne kontroly tkaniva

Negatívna kontrola tkaniva sa má vyšetriť po pozitívnej kontrole tkaniva na účely overenia špecifického značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou. Neprítomnosť špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkaniva potvrdzuje nedostatočnú skríženú reaktivitu protilátky s bunkami alebo bunkovými komponentmi. Ak je tkanivo kontrastne farbené, môže dôjsť k farbeniu okolo vonkajšej strany bunky, t. j. v intersticiálnych priestoroch. Ak v negatívnej kontrole tkaniva dôjde k špecifickému farbeniu, výsledky vzorky pacienta sa majú považovať za neplatné.

Negatívne kontrolné reagentie

Ak dôjde k nešpecifickému farbeniu, bude mať difúzny (rozptýlený) vzhľad. Zriedkavé ľahké farbenie spojovacieho tkaniva možno pozorovať aj na tkanivových rezoch, ktoré sú nadmerne fixované formalínom. Na interpretáciu výsledkov zafarbenia treba použiť intaktné bunky, pretože nekrotické alebo degenerované bunky majú často nešpecifické zafarbenie.

Tkanivo pacienta

Vzorky pacientov je potrebné preskúmať ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je potrebné vyhodnotiť v kontexte akéhokoľvek farbenia pozadia negatívnej kontrolnej reagentie. Ako pri každom imunohistochemickom teste negatívny výsledok znamená, že daný antigén nebol zaznamenaný, nie že antigén nie je v testovaných bunkách alebo tkanive prítomný. Pri interpretácii akéhokoľvek imunohistologického výsledku je potrebné preskúmať aj morfológiu každej vzorky tkaniva pomocou rezov farbených hematoxylinom a eozínom. Morfológické zistenia pacientov a príslušné klinické údaje musí interpretovať kvalifikovaný patológ.

Skôr než sa budú výsledky interpretovať, musí kvalifikovaný patológ so skúsenosťami s imunohistochemickými postupmi vyhodnotiť pozitívne a negatívne kontroly a kvalifikovať farbený produkt.

Konvencie hodnotenia pre interpretáciu protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5)

Karcinómy prsníka, ktoré sa považujú za pozitívne na nadmernú expresiu HER2 proteínu, musia spĺňať prahové kritériá pre intenzitu farbenia (2+ alebo viac na stupnici od 0 do 3+) a percento pozitívnych nádorových buniek (vyššie ako 10 %). Farbenie sa musí tiež lokalizovať na bunkovej membráne. Cytoplazmatické farbenie môže byť stále prítomné, ale toto farbenie nie je zahrnuté do stanovenia pozitivity. Dobré zachovaná a dobre farbená oblasť tkaniva by sa mala preskúmať z hľadiska intenzity farbenia a určenia úplnosti membránového farbenia. Farbenie, ktoré úplne obklopuje cytoplazmatickú membránu, by malo byť hodnotené ako intenzita „2+“ alebo „3+“. Čiastočné farbenie membrány by malo byť hodnotené ako „1+“. Môže byť potrebné preskúmať hraničné prípady pri 40-násobnom alebo vyššom zväčšení, aby sa rozlíšila intenzita „1+“ a „2+“. Na rozdiel od prípadov hodnotených ako intenzita 3+ má farbenie hodnotené ako 2+ ostrejší a jasnejšie ohraničený prstenec, zatiaľ čo prípady hodnotené ako 3+ vykazujú veľmi hrubý obrys. Nižšie je uvedená krátka referenčná tabuľka pre kritériá farbenia, Tabuľka 5. Pozrite si výkladového sprievodcu pre protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, kde nájdete podrobnejší popis s fotografiami farbenia s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Tabuľka 5. Kritériá intenzity a vzoru farbenia bunkovej membrány s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Vzor farbenia	Hodnotenie (výkaz ošetrovateľovi lekárovi)	Hodnotenie sfarbenia HER2
Nepozorovalo sa žiadne farbenie membrány	0	Negatívne
Slabé, čiastočné farbenie membrány v akejkoľvek časti rakovinových buniek	1+	Negatívne
Slabé úplné farbenie membrány, viac ako 10 % rakovinových buniek	2+	Slabo pozitívne *
Intenzívne úplné farbenie membrány, viac ako 10 % rakovinových buniek	3+	Pozitívne

* Odporúča sa reflex k ISH

OBMEDZENIA

Všeobecné obmedzenia

- Imunohistochemia je viackrokový diagnostický proces, ktorý si vyžaduje špecializované školenie v oblasti výberu vhodných reagentov a tkanív, fixácie, spracovania, prípravy imunohistochemického skúmanka a interpretácie výsledkov farbenia.
- Farbenie tkaniva závisí od manipulácie a spracovania tkaniva pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, premývanie, sušenie, zohrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami alebo tekutinami môže viesť k vytvoreniu artefaktov, zachyteniu protilátok alebo k falošne negatívnym výsledkom. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a zalievacích metód, prípadne inherentných nepravidielností tkaniva.
- Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť interpretáciu výsledkov.

4. Klinickú interpretáciu akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho absencie je potrebné vyhodnotiť v súvislosti s klinickou anamnézou, morfológiou a inými diagnostickými testami. Klinickú interpretáciu akéhokoľvek farbenia alebo absencie farbenia je nutné doplniť morfológickými štúdiami a správnymi kontrolami aj diagnostickými testami. Kvalifikovaný patológ je zodpovedný za oboznámenie sa s protilátkami, reagensiami a metódami používanými na interpretáciu zafarbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonať v certifikovanom licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa, ktorý je zodpovedný za kontrolu farbených sklíčok a zabezpečenie vhodnosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
5. Spoločnosť VENTANA dodáva optimálne zriadené protilátky a reagenty na používanie za dodržiavania poskytnutých pokynov. Akákoľvek odchýlka od odporúčaných postupov testovania môže spôsobiť neplatnosť očakávaných výsledkov. Je potrebné využiť a zdokumentovať vhodné kontroly. Používatelia, ktorí sa odklonia od odporúčaných testovacích postupov, musia prijať zodpovednosť za interpretáciu výsledkov pacientov.
6. Tento produkt nie je určený na použitie v prietokovej cytometrii – charakteristiky výkonu sa nestanovili.
7. Reagenty môžu v tkanivách, ktoré ešte neboli testované, preukázať neočakávané reakcie. Možnosť neočakávaných reakcií nie je možné úplne eliminovať dokonca ani v prípade otestovaných skupín tkanív, a to z dôvodu biologickej variability expresie antigénu v neopláziách alebo v iných patologických tkanivách.²⁴ So zaznamenanými neočakávanými reakciami sa obráťte na miestneho zástupcu podpory.
8. Tkanivá od ľudí infikovaných vírusom hepatitídy typu B a tkanivá obsahujúce povrchový antigén hepatitídy typu B (HBsAg) môžu s chrenovou peroxidázou vykazovať nešpecifické farbenie.²⁵
9. Falošne pozitívne výsledky sa môžu vyskytnúť v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie so substrátom. Môžu byť tiež spôsobené pseudoperoxidázovou aktivitou (erytrocyty), endogénnou aktivitou peroxidázy (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (príklad: pečeň, mozog, prsník, oblička) v závislosti od typu použitého imunofarbu.²⁶
10. Negatívny výsledok znamená ako pri každom imunohistochemickom teste, že antigén nebol zaznamenaný, nie že antigén nie je v testovaných bunkách/tkanive prítomný.

ŠPECIFICKÉ OBMEDZENIA

Táto protilátka bola optimalizovaná, ako uvádza Tabuľka 1, Tabuľka 2 a Tabuľka 3 pre prístroje BenchMark IHC/ISH a detekčnú chémiu. Kvôli rozdielom vo fixácii a spracovaní tkaniva môže byť nevyhnutné predĺžiť alebo skrátiť čas inkubácie primárnej protilátky na jednotlivých vzorkách. Ďalšie informácie o premenných fixácie uvádza „Immunohistochemistry Principles and Advances“.²¹

Protilátka v kombinácii s detekčnými súpravami VENTANA a prísľušenstvom deteguje antigén, ktorý prežije bežnú fixáciu formalínom, spracovanie a rezanie tkaniva. Používatelia, ktorí sa odklonia od odporúčaných testovacích postupov, sú zodpovední za interpretáciu a validáciu výsledkov pacientov.

Sklička je potrebné farbiť okamžite, pretože antigénnosť tkanivových rezov sa môže v priebehu času znižovať a počas dlhšieho skladovania by mohla byť ohrozená vplyvmi prostredia.

Všetky analýzy sa nemusia zaregistrovať na každom prístroji. Ak chcete získať ďalšie informácie, kontaktujte miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

CHARAKTERISTIKA VÝKONU

ANALYTICKÁ ÚČINNOSŤ

Vykonal sa testy farbenia na zistenie citlivosti, špecifickosti a presnosti a výsledky sú uvedené nižšie.

Citlivosť a špecifickosť

Citlivosť/špecifickosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) bola stanovená štúdiou, ktorá neukázala žiadne špecifické membránové farbenie u väčšiny normálnych tkanív. Výsledky farbenia uvádza Tabuľka 6. Citlivosť/špecifickosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) bola tiež stanovená štúdiou, ktorá nepreukázala žiadne špecifické membránové farbenie vo väčšine neoplastických tkanív. Výsledky farbenia uvádza Tabuľka 7. Farbenie z hľadiska špecifickosti a citlivosti sa uskutočňovalo pomocou protokolu /VIEW DAB Detection Kit na prístroji BenchMark XT alebo protokolu *ultraView* na prístroji BenchMark ULTRA uvedenom vyššie.

Pozitívne farbenie tonzilárneho epitelu, epitelu pažeráka, prostaty, periférneho nervu, prstítných teliesok, rakoviny prsníka, hrubého čreva a rakoviny vaječníkov je v súlade s publikovanou literatúrou týkajúcou sa expresie HER2.

Citlivosť závisí od zachovania antigénu. Akákoľvek nesprávna manipulácia s tkanivom počas fixácie, rezania, zaliatia alebo skladovania, ktorá môže pozmeniť antigénnosť, oslabuje detekciu HER2 pomocou protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a môže viesť ku generovaniu falošne negatívnych výsledkov.

Tabuľka 6. Citlivosť/špecifickosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) bola stanovená pomocou normálnych FFPE tkanív.

Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov	Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Mozog	0/6	Tenké črevo	0/6
Mozoček	0/6	Hrubé črevo	0/46
Nadoblička	0/6	Pečeň	0/6
Vaječník	0/6	Slinná žľaza	0/3
Pankreas	0/6	Jazyk	0/3
Lymfatická uzlina	0/12	Oblička	0/6
Podmozgová žľaza	0/5	Prostata	1/6
Semenník	0/6	Močový mechúr ^b	3/3
Štítna žľaza	0/6	Konečník	0/6
Prsník	0/14	Prištítné teliesko ^c	4/6
Slezina	0/6	Endometrium	0/3
Mandľa ^a	3/6	Maternica	0/3
Týmus	0/5	Krčok matrice	0/5
Kostná dreň	0/3	Endocervix	0/1
Plúca	0/6	Kostrový sval	0/6
Srdce	0/5	Koža	0/6
Perikard	0/3	Nerv	2/6
Pažerák	1/6	Mezotel	0/3
Žalúdok	0/11		

^a fokálne farbenie povrchových epiteliálnych buniek

^b membránové farbenie povrchových dáždnikových buniek

^c fokálne farbenie membrány

Tabuľka 7. Citlivosť/špecifickosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) bola stanovená testovaním rôznych neoplastických FFPE tkanív.

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Glioblastóm (mozog)	0/2
Meningeóm (mozog)	0/1
Oligodendroglióm (mozog)	0/1
Serózný adenokarcinóm (vaječník)	0/2

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Karcinóm, inak nešpecifikovaný (NOS) (vaječník)	1/2
Neuroendokrinná neoplázia (pankreas)	0/1
Adenokarcinóm (pankreas)	0/1
Karcinóm, NOS (pankreas)	0/3
Seminóm (semenník)	0/1
Embryonálny karcinóm (semenník)	0/1
Medulárny karcinóm (štítina žľaza)	0/1
Papilárny karcinóm (štítina žľaza)	0/1
Karcinóm, NOS (štítina žľaza)	0/3
Mikroinvazívny duktálny karcinóm (prsník)	2/2
Invazívny duktálny karcinóm (prsník)	42/99
Karcinóm, NOS (prsník)	1/4
Malobunkový karcinóm (pľúca)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (pľúca)	0/1
Adenokarcinóm (pľúca)	0/1
Karcinóm, NOS (pľúca)	0/2
Karcinóm skvamóznych buniek (pažerák)	0/1
Adenokarcinóm (pažerák)	0/1
Mucinózny adenokarcinóm (žalúdok)	0/4
Adenokarcinóm (žalúdok)	8/88
Karcinóm z prstencových buniek (žalúdok)	0/4
Karcinóm, NOS (žalúdok)	0/3
Adenokarcinóm (tenké črevo)	0/1
Gastrointestinálny stromálny tumor (tenké črevo)	0/1
Adenokarcinóm (hrubé črevo)	0/32
Gastrointestinálny stromálny tumor (hrubé črevo)	0/1
Karcinóm, NOS (hrubé črevo)	1/3
Adenokarcinóm (konečník)	1/5
Gastrointestinálny stromálny tumor (konečník)	0/1
Melanóm (konečník)	0/1
Hepatocelulárny karcinóm (pečeň)	0/3
Hepatoblastóm (pečeň)	0/1
Karcinóm, NOS (pečeň)	0/3
Jasnobunkový karcinóm (oblička)	0/1
Karcinóm, NOS (oblička)	0/5
Adenokarcinóm (prostata)	0/2

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Karcinóm, NOS (prostata)	0/3
Leiomyóm (maternica)	0/1
Adenokarcinóm (maternica)	0/1
Jasnobunkový karcinóm (maternica)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (krčok maternice)	0/2
Embryonálny rhabdomyosarkóm (priečne pruhovaný sval)	0/1
Karcinóm z bazálnych buniek (koža)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (koža)	1/1
Neurofibróz (lumbárny)	0/1
Neuroblastóm (retroperitoneum)	0/1
Mezotelióm (peritoneum)	0/1
Pleomorfny rhabdomyosarkóm (peritoneum)	0/1
Lymfóm, NOS	0/3
Lymfóm B-buniek, NOS (slezina)	0/1
Lymfóm B-buniek, NOS (lymfatická uzlina)	0/2
Hodgkinov lymfóm (lymfatická uzlina)	0/1
Urotelový karcinóm (močový mechúr)	1/1
Leiomyosarkóm (močový mechúr)	0/1
Osteosarkóm (kosť)	0/1
Leiomyosarkóm (hladký sval)	0/1
Adenokarcinóm konečníka (metastatický)	0/1
Adenokarcinóm hrubého čreva (metastatický)	0/7
Mucinózny adenokarcinóm hrubého čreva (metastatický)	0/1
Neuroendokrinná neoplázia, NOS	0/2
Leiomyóm	0/2
Melanóm	0/2
Sarkóm, NOS	0/2
Nediferencovaný karcinóm, NOS	0/1

Opakovateľnosť a reprodukovateľnosť

Štúdie opakovateľnosti a strednej presnosti

Reprodukovateľnosť farbenia v rámci cyklu na prístroji BenchMark XT bola určená zafarbením troch sklíčok každého z piatich tkanív rakoviny prsníka s hodnotením 0, 1+, 2+ a 3+ pre expresiu HER-2. V každom prípade sa tri z 3 sklíčok primerane farbili v rámci cyklu a pri všetkých testovaných prístrojoch. Používatelia musia overiť výsledky reprodukovateľnosti v rámci cyklu farbením niekoľkých súborov sériových rezov s nízkou, strednou a vysokou hustotou antigénu v jednom cykle.

Reprodukovateľnosť farbenia medzi cyklami a platformami bola stanovená farbením troch sklíčok, každého z piatich tkanív rakoviny prsníka s hodnotením 0, 1+, 2+ a 3+ pre expresiu HER-2 v troch rôznych prístrojových cykloch na prístroji BenchMark XT. V každom prípade sa 9 z 9 sklíčok primerane zafarbilo v troch prístrojových cykloch a na

všetkých testovaných prístrojoch. Používatelia musia overiť výsledky reprodukovateľnosti medzi cyklami farbením niekoľkých súborov sériových rezov s nízkou, strednou a vysokou hustotou antigénu v rôznych dňoch.

Reprodukovateľnosť medzi šaržami

Reprodukovateľnosť medzi šaržami bola stanovená automatickým farbením 5 tkanív rakoviny prsníka s hodnotením 0, 1+, 2+ a 3+ pre expresiu HER2 s 3 šaržami protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5). Farbené tkanivá boli hodnotené na stupnici od 0 do 3+ tromi kvalifikovanými čitateľmi. Pri 3 sklíčkach a 5 farbených tkanivách bola dosiahnutá 100 % zhoda medzi šaržami a čitateľmi.

Štúdie reprodukovateľnosti medzi laboratóriami a medzi čitateľmi na prístroji BenchMark XT

Reprodukovateľnosť hodnotenia farbenia medzi laboratóriami a medzi čitateľmi na prístroji BenchMark XT: štúdie reprodukovateľnosti medzi laboratóriami sa zúčastnili tri laboratória zo samostatných inštitúcií v Spojených štátoch. Sklíčka s rezmi 40 neutrálnych pufrovaných prípadov invazívneho karcinómu prsníka fixovaného formalínom [po 10 z každej kategórie triedenia podľa HER-2 (0 – 1+, 2+, 3+)] a šesť (6) kontrolných sklíčok PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides bolo odoslaných na každé z pracovísk farbenia na účely farbenia prístroji BenchMark XT s uplatnením odporúčaného protokolu farbenia. Kontroly zahŕňali kontrolné sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého prípadu farbené negatívnym Ig činidlom. Žiadne pracoviská nezaznamenali neplatné cykly na základe posúdenia účinnosti kontrol. Výsledky boli analyzované spoločnosťou Ventana. Tridsaťštyri zo štyridsiatich (34/40) sklíčok vykazovalo podobnú intenzitu farbenia naprieč pracoviskami farbenia. Šesť vzoriek (6/40 alebo 15 %) sa nelíšilo o viac ako 1 úroveň intenzity. U troch (3/6) vzoriek bola zaznamenaná variácia medzi 0 a 1+, pričom obe sa považujú za negatívne. U dvoch vzoriek (2/40 alebo 5 %) sa zaznamenala variácia medzi 2+ a 3+ a u jednej vzorky (1/40) variácia medzi 1+ a 2+. Vo všetkých zo 40 prípadov (100 %) dospel k zhode minimálne 2 z 3 patológov.

Charakteristika výkonu na prístroji BenchMark ULTRA pri použití detekčnej súpravy VUEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit.

Reprodukovateľnosť farbenia medzi laboratóriami a dňami na prístroji BenchMark ULTRA

Na štúdiu reprodukovateľnosti medzi laboratóriami sa podieľali tri laboratória zo samostatných inštitúcií v Spojených štátoch. Sklíčka s rezmi 48 prípadov invazívneho karcinómu prsníka FFPE [po 12 z každej kategórie triedenia podľa HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] a 1 pár kontrolných sklíčok PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides na každý z 12 cyklov farbenia boli distribuované do pracovísk štúdie na farbenie na prístroji BenchMark ULTRA s použitím odporúčaného protokolu farbenia a detekčnej súpravy ultraView Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahŕňali kontrolné sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého prípadu farbené negatívnym Ig činidlom. Patológovia, zaslepení k stavu prípadu, vyhodnotili sklíčka a poskytli klinické hodnotenie (t. j. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky boli analyzované spoločnosťou Ventana. Pri použití štandardnej nomenklatury pre tabuľky 2x2, priemerná pozitívna zhoda (APA) naprieč pracoviskami bola vypočítaná ako $2a/(2a+b+c)$ a priemerná negatívna zhoda (ANA) bola vypočítaná ako $2d/(2d+b+c)$. Naprieč všetkými pracoviskami dosahovalo APA medzi pracoviskami na základe klinického hodnotenia (pozitívne, negatívne) hodnotu 90.0 % (108/120) a ANA hodnotu 92.9 % (156/168). Pre párové porovnanie pracovísk sa APA vypočítalo ako $a/(a+c)$ a ANA sa vypočítalo ako $d/(b+d)$. Miery APA medzi pracoviskami dosiahli 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) a 89.5 % (34/38) pre pracovisko A vs. pracovisko B, pracovisko A vs. pracovisko C resp. pracovisko B vs. pracovisko C. Miery ANA medzi pracoviskami dosiahli 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) a 93.1 % (54/58) pre pracovisko A vs. pracovisko B, pracovisko A vs. pracovisko C resp. pracovisko B vs. pracovisko C.

Nasledujúca Tabuľka 8, Tabuľka 9 a Tabuľka 10 uvádza 3x3 prezentácie výsledkov pre každého čitateľa na základe klinického hodnotenia, pričom 2+ a 3+ boli oddelené:

Tabuľka 8. Miery zhody medzi laboratóriami, pracovisko A vs. pracovisko B, analýza 3x3 – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracovisko A	Pracovisko B			
	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26

Pracovisko A	Pracovisko B			
	3+	2+	0, 1+	Celkom
Celkom	12	9	27	48
Percento celkovej zhody (OPA): n/N (%)			43/48 (89.6)	

Tabuľka 9. Miery zhody medzi laboratóriami, pracovisko A vs. pracovisko C, analýza 3x3 – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracovisko A	Pracovisko C			
	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Celkom	12	5	31	48
Percento celkovej zhody (OPA): n/N (%)			42/48 (87.5)	

Tabuľka 10. Miery zhody medzi laboratóriami, pracovisko B vs. pracovisko C, analýza 3x3 – protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA s detekčnou súpravou ultraView Universal DAB Detection Kit.

Pracovisko B	Pracovisko C			
	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Celkom	12	5	31	48
Percento celkovej zhody (OPA): n/N (%)			44/48 (91.7)	

Reprodukovateľnosť farbenia medzi dňami na prístroji BenchMark ULTRA

Časť štúdie zameraná na reprodukovateľnosť medzi dňami (IDR) zahŕňala 12 prípadov so zamýšľanou distribúciou približne troch (3) prípadov v každom klinickom hodnotení (0, 1+, 2+, 3+). Celkovo päť cyklov na prístroji BenchMark ULTRA v jednej inštitúcii (pracovisko C) vykonávajúcej časť IDR štúdie prebiehalo počas minimálne 20 dní takým spôsobom, že žiadne dva dni farbenia nenasledovali po sebe. Miery IDR APA a ANA na základe klinického hodnotenia farbenia protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na pracovisku C počas všetkých dní dosahovali 100 %. Percento celkovej zhody (OPA) pre porovnania medzi dňami založené na klinickom hodnotení dosahovalo 100 % pre každé z porovnaní medzi dňami a pre všetky dni spolu.

Štúdie reprodukovateľnosti medzi laboratóriami a medzi čitateľmi na prístroji BenchMark ULTRA PLUS pomocou detekčnej súpravy ultraView Universal DAB Detection Kit

Na štúdiu reprodukovateľnosti medzi laboratóriami sa podieľali tri laboratória zo samostatných inštitúcií v Spojených štátoch. Sklíčka s rezmi 28 prípadov invazívneho karcinómu prsníka FFPE [po 7 z kategórií triedenia podľa HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] a pár kontrolných sklíčok (jedno kontrolné sklíčko PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide a jeden prípad kontrolného tkaniva karcinómu prsníka a druhé sklíčko každého prípadu farbené negatívnym Ig činidlom. Patológovia, zaslepení k stavu prípadu, vyhodnotili sklíčka a poskytli klinické hodnotenie (t. j. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky boli analyzované spoločnosťou Ventana.

Reprodukovateľnosť stavu HER2 (pozitívny alebo negatívny) sa vyhodnotila pre všetky hodnotiteľné sklíčka prípadov pomocou modálneho stavu HER2 na úrovni prípadu ako

referencie pre každý prípad. Na účely výpočtu miery zhody sa hodnotenie HER2 0 alebo 1+ považovalo za negatívne, zatiaľ čo hodnotenie HER2 2+ alebo 3+ sa považovalo za pozitívne. Modálny stav HER2 pre každý prípad bol stanovený ako najčastejšie pozorovaný výsledok čitateľa (pozitívny alebo negatívny) pre daný prípad. Všetky pozorovania získané združením všetkých pracovísk, čitateľov, dní a prípadov pre populáciu všetkých hodnotiteľných prípadov sa porovnávali s výsledkami modálneho stavu HER2. PPA, NPA a OPA pre združenú analýzu bolo 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420), resp. 97.7 % (821/840). Reprodukovateľnosť stavu HER2 bola hodnotená aj ako miera APA, ANA a OPA pre všetky možné párové porovnania medzi pracoviskami a pre všetky porovnania medzi pracoviskami dohromady. Pokiaľ ide o reprodukovateľnosť medzi pracoviskami, dosiahnuté boli miery APA, ANA a OPA 95.9 %, 95.9 % resp. 95.9 %. Pokiaľ ide o reprodukovateľnosť medzi čitateľmi, výsledky pre APA, ANA a OPA boli 95.5 %, 95.5 % resp. 95.5 %. Pokiaľ ide o reprodukovateľnosť medzi dňami, miery APA, ANA a OPA dosahovali 97.0 %, 97.0 % resp. 97.0 %. Obojstranné 95 % CI boli vypočítané pomocou percentilovej metódy bootstrap.

Tabuľky 11 – 14 predstavujú prezentácie týchto výsledkov.

Tabuľka 11. Združená zhoda stavu HER2 s modálnym stavom na úrovni prípadu pre prípady karcinómu prsníka farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA PLUS.

Stav HER2	Modálny stav BenchMark ULTRA PLUS		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	411	10	421
Negatívne	9	410	419
Celkom	420	420	840
	n/N	% (95 % CI)	
Percento pozitívnej zhody	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Percento negatívnej zhody	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Percento celkovej zhody	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

Tabuľka 12. Miery zhody združené na úrovni pracoviska pre párové porovnania stavu HER2 pre prípady karcinómu prsníka farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA PLUS.

Stav HER2 z pracoviska i	Stav HER2 z pracoviska j		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	4037	163	4200
Negatívne	183	4017	4200
Celkom	4220	4180	8400
	n/N	% (95 % CI)	
Priemerná pozitívna zhoda	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Priemerná negatívna zhoda	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Percento celkovej zhody	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Poznámka: Pracovisko i a j sú pracoviská (pracovisko A, pracovisko B a pracovisko C) použité v rámci štúdie. Združená miera zhody sa vypočítava združením všetkých možných porovnaní medzi všetkými pracoviskami (pracovisko A vs. B, A vs. C a B vs. C).

Tabuľka 13. Združené miery zhody medzi čitateľmi pre párové porovnania stavu HER2 pre prípady karcinómu prsníka farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA PLUS.

Stav HER2 od čitateľa 1	Stav HER2 od čitateľa 2		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	201	9	210
Negatívne	10	200	210

Stav HER2 od čitateľa 1	Stav HER2 od čitateľa 2		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Celkom	211	209	420
	n/N	% (95 % CI)	
Priemerná pozitívna zhoda	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Priemerná negatívna zhoda	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Percento celkovej zhody	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Poznámka: Čitateľ 1 a 2 sú čitateľa z rovnakého pracoviska štúdie (pracovisko A, pracovisko B alebo pracovisko C) používaní v rámci štúdie. Združená miera zhody sa vypočítava združením zhôd medzi čitateľmi v rámci jedného pracoviska naprieč všetkými pracoviskami štúdie.

Tabuľka 14. Združené miery zhody medzi dňami pre párové porovnania stavu HER2 pre prípady karcinómu prsníka farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA PLUS.

Stav HER2 zo dňa i	Stav HER2 zo dňa j		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	817	15	832
Negatívne	35	813	848
Celkom	852	828	1680
	n/N	% (95 % CI)	
Priemerná pozitívna zhoda	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Priemerná negatívna zhoda	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Percento celkovej zhody	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Poznámka: Deň i a j sú dni (deň 1 až deň 5) z dní farbenia štúdie. Združená miera zhody sa vypočítava spojením všetkých možných porovnaní medzi akýmikoľvek dvoma dňami v rámci každého čitateľa z každého pracoviska.

Porovnávacia štúdia prístroja BenchMark ULTRA a prístroja BenchMark XT

Na porovnávací štúdiu platformami sa zúčastnili dve laboratória farbenia a tri pracoviská vykonávajúce odčítanie v Spojených štátoch. Sklička s rezmi 280 prípadov invazívneho karcinómu prsníka FFPE [približne 70 prípadov z každej kategórie triedenia podľa HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] boli náhodne rozdelené medzi dve pracoviská farbenia (140 prípadov na každé pracovisko) na účely farbenia na prístroji BenchMark XT a prístroji BenchMark ULTRA uplatnením príslušných odporúčaných protokolov farbenia a detekčnej súpravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahŕňali kontrolné sklička PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé skličko každého prípadu farbené negatívnym Ig činidlom. Farbené prípady z pracoviska 1 a pracoviska 2 sa rozdelili do štyroch súprav sklíčok a poskytili sa po jednom trom rôznym kvalifikovaným čitateľom (patológom), jednému čitateľovi na pracovisku 1, jednému na pracovisku 2 a jednému na pracovisku 3. Patológovia zaslepení k stavu prípadu a farbiacej platforme, vyhodnotili všetky štyri súpravy sklíčok a poskytli klinické hodnotenie (t. j. 0, 1+, 2+, 3+) pre každý prípad. Výsledky boli analyzované spoločnosťou Ventana. Miery PPA (a spodná hranica obojstranného 95 % intervalu spoľahlivosti) pre farbenie klonu protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT na základe pozitívneho verus negatívneho klinického hodnotenia dosahovali 91.9 % (85.8), 91.2 % (85.3) a 94.9 % (89.3) pre čitateľa A, B resp. C. Miery NPA (a spodná hranica obojstranného 95 % intervalu spoľahlivosti) pre farbenie klonu protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT na základe pozitívneho verus negatívneho klinického hodnotenia dosahovali 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3), a 99.3 % (96.3) pre čitateľa A, B resp. C. OPA medzi protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) s použitím prístroja BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT na základe 2x2 analýzy pozitívneho verus negatívneho klinického hodnotenia 91.8 %, 92.5 % a 97.4 % pre čitateľa A, B resp. C. 3x3 prezentáciu miery zhody medzi platformami pre každého čitateľa na základe klinického hodnotenia (0/1+, 2+, 3+) uvádza Tabuľka 15, Tabuľka 16 a Tabuľka 17.

Tabuľka 15. Miery zhody medzi platformami pri analýze 3x3, BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT – čitateľ A.

Prístroj BenchMark ULTRA	Prístroj BenchMark XT			
Čitateľ A	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Celkom	96	47	124	267
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			226/267 (84.6) (79.8-88.5)	

Tabuľka 16. Miery zhody medzi platformami pri analýze 3x3, BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT – čitateľ B.

Prístroj BenchMark ULTRA	Prístroj BenchMark XT			
Čitateľ B	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Celkom	69	68	130	267
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			242/267 (90.6) (86.5-93.6)	

Tabuľka 17. Miery zhody medzi platformami pri analýze 3x3, BenchMark ULTRA v porovnaní s prístrojom BenchMark XT – čitateľ C.

Prístroj BenchMark ULTRA	Prístroj BenchMark XT			
Čitateľ C	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Celkom	66	52	149	267
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			257/267 (96.3) (93.2-98.0)	

Porovnávací štúdiá prístrojov BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA

Tri laboratória zo samostatných inštitúcií v Spojených štátoch sa zúčastnili štúdie zhody medzi prístrojmi BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA. Sklička s rezmi FFPE 122 prípadov invazívneho karcinómu prsníka z každej kategórie triedenia podľa HER-2 (0, 1+, 2+, 3+) boli farbené spoločnosťou Ventana na prístroji BenchMark ULTRA s použitím odporúčaného protokolu farbenia a detekčnej súpravy *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Kontroly obsahovali jedno kontrolné skličko PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide a jeden prípad pozitívneho kontrolného tkaniva karcinómu prsníka na jeden cyklus farbenia. Navyše, druhé skličko z každého testovaného prípadu bolo farbené negatívnym Ig činidlom. Sklička s rezmi z tých istých prípadov boli randomizované a rovnomerne rozdelené (40 – 41 prípadov na jedno pracovisko) medzi pracoviská štúdie na farbenie na prístroji BenchMark ULTRA PLUS s použitím odporúčaného protokolu farbenia a detekčnej súpravy *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Kontrolы obsahovali jedno kontrolné skličko PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide a jeden prípad pozitívneho kontrolného tkaniva karcinómu prsníka na jeden cyklus farbenia. Navyše, druhé skličko z každého testovaného prípadu bolo farbené negatívnym Ig činidlom. Patológovia, zaslepení k stavu prípadu, vyhodnotili sklička farbené na jednom prístroji BenchMark IHC/ISH a poskytli klinické hodnotenie (t. j. 0, 1+, 2+, 3+). Po 2-tyždňovom vymývanom

období patológovia vyhodnotili sklička zafarbené na druhom prístroji BenchMark IHC/ISH. Výsledky boli analyzované spoločnosťou Ventana. Hodnotenie HER2 IHC 0 alebo 1+ sa považovalo za negatívne, zatiaľ čo hodnotenie HER2 IHC 2+ alebo 3+ sa považovalo za pozitívne. Miery OPA, PPA a NPA dosahovali 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) resp. 89.1 % (179/201). Obojstranné 95 % CI boli vypočítané pomocou percentilovej metódy bootstrap. Miery prijateľnosti pozadia a morfológie dosiahli vo všetkých prípadoch a na oboch prístrojoch 100 %. Tabuľka 18 prezentuje tieto výsledky.

Tabuľka 18. Združená zhoda stavu HER2 pre prípady karcinómu prsníka farbené s protilátkou anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA PLUS v porovnaní s prístrojom BenchMark ULTRA

Stav BenchMark ULTRA PLUS HER2	Stav BenchMark ULTRA HER2		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	154	22	176
Negatívne	11	179	190
Celkom	165	201	366
	n/N	% (95 % CI)	
Percento pozitívnej zhody	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Percento negatívnej zhody	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Percento celkovej zhody	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

Reprodukovateľnosť medzi patológmi u vzoriek komparatívnych štúdií platformami

Miery pozitívnej a negatívnej zhody s obojstrannými 95 % intervalmi spoľahlivosti boli vypočítané pre šesť možných párových porovnaní medzi čitateľmi pre každú platformu.

Na prístroji BenchMark ULTRA boli PPA miery pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) resp. 83.5 % (111/133). Miery NPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B boli 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) resp. 98.5 % (132/134). Miera OPA bola najvyššia medzi čitateľom A a čitateľom B (91.8 %) a nižšia medzi čitateľom B a čitateľom C (91.0 %) a čitateľom A a čitateľom C (88.8 %).

Na prístroji BenchMark XT boli PPA miery pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) resp. 84.7 % (116/137). Miery NPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B boli 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) a 98.5 % (128/130). Miera OPA bola najvyššia medzi čitateľom A a čitateľom B (92.5 %) a nižšia medzi čitateľom B a čitateľom C (91.4 %) a čitateľom A a čitateľom C (89.1 %).

Porovnávací štúdiá detekčných súprav IVIEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit

Kohorta pracoviska 1 so 140 prípadmi FFPE invazívneho karcinómu prsníka [približne 35 prípadov z každej kategórie triedenia podľa HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] bola použitá v porovnávací štúdií súprav IVIEW DAB Detection Kit a *ultraView Universal DAB Detection Kit* pri farbení s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA. Na porovnávací štúdií detekcie sa zúčastnilo jedno laboratórium farbenia a tri pracoviská vykonávajúce odčítanie v Spojených štátoch. Pri farbení protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA miery PPA medzi výsledkami získanými pomocou metód IVIEW DAB Detection Kit a *ultraView Universal DAB Detection Kit* založené na klinickom hodnotení (pozitívne, negatívne) dosahovali 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65), a 96.5 % (55/57) pri čitateľoch A, B resp. C, zatiaľ čo miery NPA medzi metódami detekcie dosahovali 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) a 97.5 % (77/79) pri čitateľoch A, B resp. C. Miery OPA medzi detekčnými súpravami dosahovali 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) a 97.1 % (132/136) pri čitateľoch A, B resp. C. 3x3 prezentáciu miery zhody komparácie detekcie pre každého čitateľa na základe klinického hodnotenia (0/1+, 2+, 3+) uvádza Tabuľka 19, Tabuľka 20 a Tabuľka 21.

Tabuľka 19. Čitateľ A, miery zhody VIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit, analýza 3x3 – farbenie protilátky PATHWAY HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Čitateľ A	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Celkom	46	25	65	136
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			119/136 (87.5) (80.9-92.0)	

Tabuľka 20. Čitateľ B, miery zhody VIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit, analýza 3x3 – farbenie protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Čitateľ B	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Celkom	33	32	71	136
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			128/136 (94.1) (88.8-97.0)	

Tabuľka 21. Čitateľ C, miery zhody VIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit, analýza 3x3 – farbenie protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) na prístroji BenchMark ULTRA.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Čitateľ C	3+	2+	0, 1+	Celkom
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Celkom	32	25	79	136
Percento celkovej zhody: n/N (%) (95 % CI)			132/136 (97.1) (92.7-98.9)	

Reprodukovateľnosť medzi patológmi u vzoriek komparatívnych štúdií detekcie

Miery pozitívnej a negatívnej zhody s obojstrannými 95 % intervalmi spoľahlivosti boli vypočítané pre šesť možných párových porovnaní medzi čitateľmi pre každú metódu.

Pri detekčnej súprave VIEW DAB Detection Kit boli miery PPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) resp. 79.7 % (55/69). Miery NPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B boli 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) resp. 97.0 % (65/67). Miera všeobecnej zhody bola najvyššia medzi čitateľom A a čitateľom B (96.3%) a nižšia medzi čitateľom A a čitateľom C (86.0 %) a čitateľom B a čitateľom C (88.2 %).

Pri detekčnej súprave ultraView Universal DAB Detection Kit boli miery PPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) resp. 86.2 % (56/65). Miery NPA pri čitateľovi A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B boli 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) resp. 98.6 % (70/71). Celková miera zhody bola podobná pri všetkých dvojiciach čitateľov, 92.6 % (126/136), 88.2 %

(120/136) a 92.6 % (126/136) pri čitateľovi A vs. B, pri čitateľovi A vs. C resp. pri čitateľovi B vs. C.

KLINICKÁ ÚČINNOSŤ

Štúdie porovnania protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody

Bola uskutočnená porovnávacia štúdia metód na preskúmanie korelácie výsledkov medzi protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) a PathVysion HER2 FISH, pričom v oboch prípadoch ide o diagnostické testy so schválením FDA. Na štúdiu sa zúčastnilo šesť patológov. Dve súpavy troch rôznych výskumníkov hodnotili dve nezávislé kohorty (kohorta 1: n = 144, kohorta 2: n = 178) s použitím známych prípadov rakoviny prsníka farbených s HER2 CB11 a HER2 4B5. Údaje FISH boli získané z anamnézy pacienta. Pre každý prípad sa získalo konsenzuálne hodnotenie od troch čitateľov pre každú protilátku, aby sa znížila variabilita jedného čitateľa, o ktorej je známe, že vzniká pri hodnoteniach HER2.^{27,28,29} Celkovo bolo hodnotených 322 prípadov. Sklička farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) boli spracované a farbené podľa inštrukcií výrobcu špecifikovaných v metodickom liste protilátky CB11. Medzi farbením a čítaním skličiek farbených s protilátkou CB11 bol odstup v priemere približne jeden rok. Keďže hodnotenie od jedného zo šiestich čitateľov bolo mimo intervalu spoľahlivosti, údaje z dvoch kohort sú prezentované takto.

Reprodukovateľnosť medzi patológmi pri vzorkách komparatívnych štúdií

Tabuľka 22. Kohorta 1 – Konsenzuálne IHC hodnotenie troch patológov.

Hodnotenie 4B5	Hodnotenie CB11			Celkom
	3+	2+	0, 1+	
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Celkom	31	37	75	143
Kohorta 1: charakteristika výkonu pre prezentáciu 3 x 3. Celková zhoda je (29+13+53)/143 = 66.4 % (95 % CI = 38.6 %, 59.7 %). Kohorta 1: charakteristika výkonu pre prezentáciu 2 x 2 (pozitívne (2+ a 3+) a negatívne (0+ a 1+) hodnotenia protilátky HER2 sú skombinované). - Percento pozitívnej zhody je (29+2+24+13)/(31+37) = 100 % (95 % CI = 97.5 % – 100 %). - Percento negatívnej zhody je 53/75 = 70.7 % (95 % CI = 58.5 % – 80.1 %). - Celková zhoda je (29+24+2+13+53)/143 = 84.7 % (95 % CI = 78.2 % – 90.0 %).				

Tabuľka 23. Kohorta 2 – Konsenzuálne IHC hodnotenie troch patológov.

Hodnotenie 4B5	Hodnotenie CB11			Celkom
	3+	2+	0, 1+	
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Celkom	73	20	85	178
Kohorta 2: charakteristika výkonu pre prezentáciu 3 x 3. Celková zhoda je (72+12+80)/178 = 92.1% (95 % CI = 80.1 %, 93.1 %). Kohorta 2: charakteristika výkonu pre prezentáciu 2 x 2 (pozitívne (2+ a 3+) a negatívne (0+ a 1+) hodnotenia protilátky HER2 sú skombinované). - Percento pozitívnej zhody je (72+12+1+1)/(73+20) = 92.5 % (95 % CI = 85.2 % – 96.9 %). - Percento negatívnej zhody je 80/85 = 94.1 % (95 % CI = 86.8 % – 98.1 %). - Celková zhoda je (72+12+1+1+80)/178 = 93.3 % (95 % CI = 88.5 % – 96.4 %).				

Tabuľka 24. Kohorta 1: konsenzus IHC hodnotení CB11 troch patológov v porovnaní s FISH.

Hodnotenie CB11	Výsledok FISH		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Celkom	86	58	144

Kohorta 1: charakteristika výkonu pre CB11 a FISH, prezentácia 2 x 2 (kde hodnotenie 2 a 3 sa považuje za pozitívne).

- Percento pozitívnej zhody je $(32+32)/86 = 74.4\%$ (95 % CI = 63.8 % – 83.2%).
- Percento negatívnej zhody je $53/58 = 91.4\%$ (95 % CI = 80.9 % – 97.1 %).
- Celková zhoda je $(32+32+53)/144 = 81.2\%$ (95 % CI = 73.9 % – 87.2 %).

Tabuľka 25. Kohorta 1: konsenzus IHC hodnotení 4B5 troch patológov v porovnaní s FISH.

Hodnotenie 4B5	Výsledok FISH		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Celkom	86	58	144

Kohorta 1: charakteristika výkonu pre 4B5 a FISH, prezentácia 2 x 2 (kde hodnotenie 2 a 3 sa považuje za pozitívne).

- Percento pozitívnej zhody je $(55+25)/86 = 93.0\%$ (95 % CI = 87.9 % – 96.3%).
- Percento negatívnej zhody je $47/58 = 81.0\%$ (95 % CI = 73.4 % – 86.0 %).
- Celková zhoda je $(55+25+47)/144 = 88.2\%$ (95 % CI = 82.1 % – 92.2 %).

Tabuľka 26. Kohorta 2: konsenzus IHC hodnotení CB11 troch patológov v porovnaní s FISH.

Hodnotenie CB11	Výsledok FISH		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Celkom	93	85	178

Kohorta 2: charakteristika výkonu pre CB11 a FISH, prezentácia 2 x 2 (kde hodnotenie 2 a 3 sa považuje za pozitívne).

- Percento pozitívnej zhody je $(72+13)/93 = 91.3\%$ (95 % CI = 85.0 % – 96.7 %).
- Percento negatívnej zhody je $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 83.9 % – 96.3 %).
- Celková zhoda je $(72+13+77)/178 = 91.0\%$ (95 % CI = 86.5 % – 94.9 %).

Tabuľka 27. Kohorta 2 – konsenzus IHC hodnotení 4B5 troch patológov: v porovnaní s FISH.

Hodnotenie 4B5	Výsledok FISH		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87

Hodnotenie 4B5	Výsledok FISH		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Celkom	93	85	178

Kohorta 2: charakteristika výkonu pre 4B5 a FISH, prezentácia 2 x 2 (kde hodnotenie 2 a 3 sa považuje za pozitívne).

- Percento pozitívnej zhody je $(72+11)/93 = 89.2\%$ (95 % CI = 82.5 % – 95.1 %)
- Percento negatívnej zhody je $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 84.0 % – 96.4%)
- Celková zhoda je $(72+11+77)/178 = 90.0\%$ (95 % CI = 85.4 % – 93.6 %)

Reprodukovateľnosť medzi patológmi pri vzorkách komparatívnych štúdií

Kedže je dobre známe, že rôzni patológovia môžu mať rôzne interpretácie IHC sklíčok, traja patológovia analyzovali každú z dvoch kohort (celkovo 6 patológov), aby došlo k odčítaniu všetkých vzoriek. Na posúdenie konečných výsledkov sa uplatnilo pravidlo dva z troch. Nižšie je uvedený súhrn variabilných výsledkov získaných tromi patológmi vzoriek porovnávacej štúdie pre každú kohortu (kohorta 1: n = 178, kohorta 2: n = 144).

Tabuľka 28. Kohorta 1: hodnotenie 4B5 tromi patológmi.

Hodnotenie HER2	Hodnotenie 4B5		
	Výskumník 1	Výskumník 2	Výskumník 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Celkom	174	178	178

Poznámka: Celkovo 3 vzorky sa pri hodnotení tromi patológmi líšili o viac ako jeden stupeň (t. j. 0 – 2+).

Vzorka 1: Jeden patológ udelil hodnotenie 2+, dvaja patológovia udelili hodnotenie 0+.

Vzorka 2: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, dvaja patológovia udelili hodnotenie 2+.

Vzorka 3: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 1+ a tretí 2+.

Tabuľka 29. Kohorta 1: hodnotenie CB11 tromi patológmi.

Hodnotenie HER2	Hodnotenie CB11		
	Výskumník 1	Výskumník 2	Výskumník 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Celkom	174	178	178

Poznámka: Celkovo 1 vzorka sa pri hodnotení tromi patológmi líšila o viac ako jeden stupeň (t. j. 1 – 3+).

Vzorka 1: Jeden patológ udelil hodnotenie 1+, druhý 2+ a tretí 3+.

Tabuľka 30. Kohorta 2: hodnotenie 4B5 tromi patológmi.

Hodnotenie HER2	Hodnotenie 4B5		
	Výskumník 4	Výskumník 5	Výskumník 6
3+	59	65	50
2+	30	28	39
0,1+	52	51	55
Celkom	141	144	144

Hodnotenie HER2	Hodnotenie 4B5		
	Výskumník 4	Výskumník 5	Výskumník 6
Poznámka: Celkovo 6 vzoriek sa pri hodnotení tromi patológmi líšilo o viac ako jeden stupeň (napr. 0, 3+).			
Vzorka 1: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 0+ a tretí 2+.			
Vzorka 2: Jeden patológ udelil hodnotenie 1+, druhý 1+ a tretí 3+.			
Vzorka 3: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 2+ a tretí patológ 2+.			
Vzorka 4 a 5: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 2+ a tretí 2+.			
Vzorka 6: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 3+ a tretí 3+.			

Tabuľka 31. Kohorta 2: hodnotenie CB11 tromi patológmi.

Hodnotenie HER2	Hodnotenie CB11		
	Výskumník 4	Výskumník 5	Výskumník 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Celkom	144	144	144
Poznámka: Celkovo 8 vzoriek sa pri hodnotení tromi patológmi líšilo o viac ako jeden stupeň (t. j. 0 – 2+).			
Vzorky 1 – 6: jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 1+ a tretí 2+.			
Vzorky 7 a 8: Jeden patológ udelil hodnotenie 0+, druhý 2+ a tretí 2+.			

Nasleduje tabuľka rozsahov percentuálnej zhody medzi párami patológov (tri páry pre každú kohortu).

Tabuľka 32. Rozsahy 2X2* zhôd pre troch patológov.

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

* 0, 1+ = negatívne. 2+ a 3+ = pozitívne

Štúdiá potvrdzujúca klinické výsledky – KATHERINE

Účinnosť protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) a INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (analýza INFORM HER2 Dual ISH) bola skúmaná v randomizovanej, multicentrickej, otvorenej štúdií fázy III KATHERINE (BO27938) na vyhodnotenie účinnosti a bezpečnosti trastuzumab emtanzínu (KADCYLA) v porovnaní s trastuzumabom ako adjuvantnej liečby u pacientov s HER2-pozitívnym primárnym karcinómom prsníka, ktorí majú reziduálny nádor patologicky prítomný v prsných alebo axilárnych lymfatických uzlinách po predoperačnej terapii (NCT01772472).

Vzorky pacientov boli farbené s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a/alebo analýzou INFORM HER2 Dual ISH a hodnotené z hľadiska prijateľnosti farbenia a stavu HER2. Celkovo väčšina vzoriek pochádzala z biopsie pred liečbou (80.9 %), pričom boli odobraté primárne ako biopsia (75.3 %) alebo chirurgickými metódami (24.3 %). Viac vzoriek

vykazovalo dukálny neoplastický podtyp (95.4 %) a väčšina nebola získaná zo vzorky metastázy (96.2 %).

Tabuľka 33 opisuje celkovú mieru prijateľnosti farbenia pre protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) v populácii určenej na diagnostiku (ITD) na úrovni subjektu. Z celkového počtu 1788 subjektov v populácii PATHWAY ITD Population bolo 55 pokusov o úvodné farbenie protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) neúspešných. Keď sa farbenie pri týchto subjektoch opakovalo, úspešné farbenie sa dosiahlo u všetkých okrem štyroch z nich. Počiatočná a konečná celková miera prijateľnosti farbenia pre protilátku PATHWAY anti-HER2 (4B5) dosahovala 96.9 % resp. 99.8 %. Mieru prijateľnosti farbenia pozadia a prijateľnosti morfológie pre sklíčka farbené protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) sú tiež uvedené. Miera počiatočnej a konečnej prijateľnosti farbenia pre populáciu ITD Population boli 99.6 %, resp. 99.9 %. Miera počiatočnej a konečnej morfologickej prijateľnosti bola 99.2 % a 99.9 %.

Tabuľka 33. Charakteristika výkonu farbenia protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Atribút	% miery prijateľnosti (n/N) (95 % CI)	
	Počiatočné*	Konečné**
Celková miera prijateľnosti farbenia	96.9 (1733/1788) (96.0, 97.6)	99.8 (1784/1788) (99.4, 99.9)
Pozadie	99.6 (1768/1775) (99.2, 99.8)	99.9 (1786/1787) (99.7, 100.0)
Morfológia	99.2 (1762/1776) (98.7, 99.5)	99.9 (1787/1788) (99.7, 100.0)

* Počiatočný pokus o farbenie je prvý pokus o farbenie pre daný subjekt

** Konečný pokus o farbenie je pokus o farbenie, ktorý sa použil na rozhodnutie o zaradení do štúdie BO27938

Do štúdie KATHERINE bolo zaradených 1486 pacientov s HER2-pozitívnym raným karcinómom prsníka s reziduálnym invazívnym tumorom v prsníku a/alebo axilárnych lymfatických uzlinách po liečbe taxánom a trastuzumabom ako súčasťou neoadjuvantného režimu pred zaradením do štúdie. Pacienti dostávali rádioterapiu a/alebo hormonálnu terapiu súbežne so skúšanou liečbou podľa lokálnych usmernení. Vzorky nádoru prsníka museli preukázať nadmernú expresiu HER2 definovanú ako pomer amplifikácie 3 IHC alebo ISH ≥ 2.0 stanovený v centrálnom laboratóriu. Pacienti boli randomizovaní (1:1) na liečbu trastuzumabom alebo liekom KADCYLA. Randomizácia bola stratifikovaná podľa klinického štádia pri prezentácii, stavu hormonálnych receptorov, predoperačnej na HER2-cielenej terapie (trastuzumab, trastuzumab plus ďalšie na HER2-cielene látky) a patologického stavu uzlin vyhodnoteného po predoperačnej terapii.

Liek KADCYLA bol podaný intravenózne v dávke 3.6 mg/kg v 1. deň 21-dňového cyklu. Liek Trastuzumab bol podaný intravenózne v dávke 6 mg/kg v 1. deň 21-dňového cyklu. Pacienti boli liečení liekom KADCYLA alebo trastuzumab počas celkovo 14 cyklov, pokiaľ nedošlo k recidíve ochorenia, odvolaniu súhlasu alebo neprijateľnej toxicite, podľa toho, čo nastalo skôr. V čase primárnej analýzy bol medián trvania liečby 10 mesiacov (rozsah: 1 – 12) pre liek KADCYLA, zatiaľ čo medián trvania liečby trastuzumabom dosahoval 10 mesiacov (rozsah: 1 – 13). Pacienti, ktorí prerušili liečbu liekom KADCYLA, mohli dokončiť dĺžku určenej liečby v rámci štúdie do 14 cyklov na HER2-cielenej liečby trastuzumabom, ak to bolo vhodné na základe hľadísk toxicity resp. podľa uváženia výskumníka.

Primárnym cieľovým ukazovateľom účinnosti štúdie KATHERINE bolo prežívanie bez výskytu invazívnych chorôb (IDFS). IDFS bol definovaný ako čas od dátumu randomizácie do prvého výskytu recidívy ipsilaterálneho invazívneho nádoru prsníka, recidívy ipsilaterálneho lokálneho alebo regionálneho invazívneho karcinómu prsníka, vzdialenej recidívy, kontralaterálneho invazívneho karcinómu prsníka alebo úmrtia z akejkoľvek príčiny.

Demografické charakteristiky pacienta a východiskové charakteristiky tumoru boli medzi vetvami liečby vyvážené. Stredný vek bol približne 49 rokov (rozsah 23 – 80 rokov), 72.8 % tvorili belosi, 8.7 % Ázijci a 2.7 % černosi alebo Afroameričania. Všetci pacienti okrem 5 boli ženy. 22.5 percenta pacientov bolo zaradených v Severnej Amerike, 54.2 % v Európe a 23.3 % vo zvyšku sveta. Prognostické charakteristiky nádoru vrátane stavu hormonálnych receptorov (pozitívne: 72.3 %, negatívne: 27.7 %), klinického štádia pri prezentácii (neoperovateľné: 25.3 %, operovateľné: 74.8 %) a patologického stavu uzlin po predoperačnej terapii (pozitívne uzliny: 46.4 %, negatívne uzliny nehodnotené: 53.6 %) boli v jednotlivých vetvách štúdie podobné.

Väčšina pacientov (76.9 %) podstupovala režim neoadjuvantnej chemoterapie obsahujúcej antracyklín. 19.5 % pacientov dostalo ďalšiu na HER2-cielenu látku popri

trastuzumabe ako zložku neoadjuvantnej liečby. Pertuzumab bol druhou terapiou u 93.8 % pacientov, ktorí dostávali druhé neoadjuvantné liečivo ciele na HER2.

Klinicky významné a štatisticky významné zlepšenie IDFS sa pozorovalo u pacientov, ktorých vzorky rakoviny prsníka boli identifikované ako HER2-pozitívne s analýzou PATHWAY anti-HER2 (4B5), ktorí dostávali trastuzumab emtanzín (KADCYLA) v porovnaní s trastuzumabom (Herceptin) (HR = 0.43, 95 % CI [0.32, 0.58]), čo zodpovedá 57 % zníženiu rizika prihod IDFS. Výsledky účinnosti pre IHC pozitívnu podskupinu uvádza Tabuľka 34 a obrázok 2.

Analýza údajov tiež naznačuje, že s korekciou alebo bez korekcie za rozdielny odber vzoriek v populácii štúdie v dôsledku predbežného skríningu lokálneho testu sú odhady účinnosti lieku podobné.

Tabuľka 34. Účinnosť je výstupom zo štúdie KATHERINE pre IHC pozitívnu podskupinu.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
<i>Primárny koncový bod</i>	Prežívanie bez výskytu invazívnych chorôb (IDFS) ¹	
Podiel (%) pacientov s udalosťou	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [95 % CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
3-ročná miera bez príhod ² %	89.0	75.7

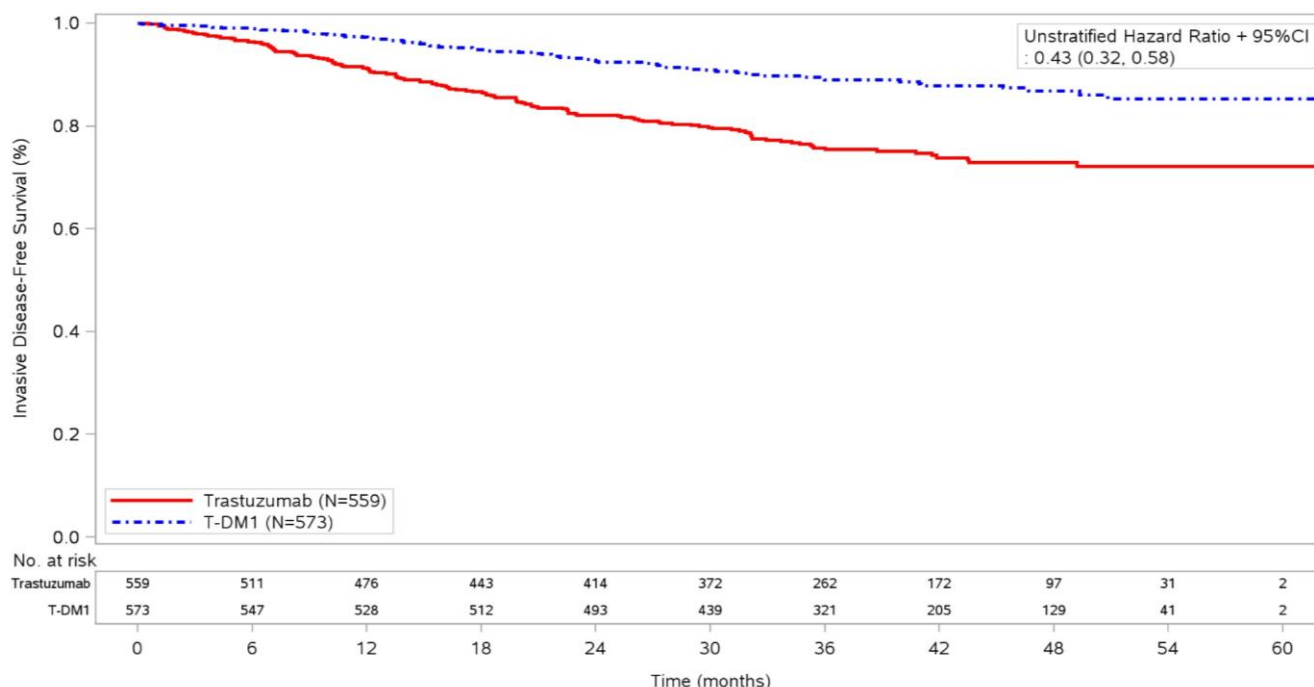
1. Údaje z prvej priebežnej analýzy

2. 3-ročná miera bez príhod odvodená z Kaplan-Meierových odhadov

Údaje zo štúdie KATHERINE naznačujú, že adjuvantný trastuzumab emtanzín (KADCYLA) preukázal jasný prínos v rámci liečby v porovnaní s adjuvantným trastuzumabom (Herceptin) u pacientov s HER2-pozitívnym raným karcinómom prsníka s reziduálnym ochorením po ukončení neoadjuvantnej liečby. Analýzy PATHWAY anti-HER2 (4B5) a INFORM HER2 Dual ISH sú prínosné pri identifikácii tých pacientov, u ktorých je pravdepodobné, že budú benefitovať z liečby trastuzumab emtanzínom (KADCYLA).

RIEŠENIE PROBLÉMOV

1. Ak pozitívna kontrola vykazuje slabšie farbenie, než sa očakáva, počas rovnakého cyklu prístroja skontrolujte ostatné súbežne analyzované pozitívne kontroly a stanovte, či to súvisí s primárnou protilátkou alebo jednou z bežných sekundárnych reagensii.
2. Ak je pozitívna kontrola negatívna, je potrebné skontrolovať, či má skličko správny štítok s čiarovým kódom. Ak je skličko označené správne, skontrolujte ostatné súbežne analyzované pozitívne kontroly v rovnakom prístroji, aby ste stanovili, či to súvisí s primárnou protilátkou alebo s jednou z bežných sekundárnych reagensii. Tkanivá mohli byť nesprávne odobraté, fixované alebo mohol byť nesprávne odstránený parafín. Dodržiavajte správny postup na odber, skladovanie a fixáciu.
3. Ak sa neodstránil všetok parafín, môže sa stať, že vôbec nedôjde k farbeniu. Zopakujte postup odstránenia parafínu.
4. Ak je špecifické farbenie protilátkou príliš intenzívne, zopakujte cyklus s časom inkubácie skráteným o 4-minútové intervaly, aby sa tak dosiahla požadovaná intenzita farbenia.
5. Ak sú zo sklička zmyté tkanivé rezy, sklička je potrebné skontrolovať, aby sa zabezpečilo, že sú kladne nabité.
6. Nápravné opatrenia sú uvedené v časti Podrobný postup v používateľskej príručke prístroja alebo vám ich poskytne miestny zástupca podpory.



Obrázok 2: Kaplan-Meierova krivka prežívania bez výskytu invázivného ochorenia v rámci štúdie KATHERINE. (T-DM1: trastuzumab emtanzín (KADCYLA))

LITERATÚRA

- 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, Egr, 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]. EMA (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.
- 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 Emtansine 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. Current 13. August 16, 1976.
- 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.

25. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73:626-32.
26. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
27. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
28. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
29. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

POZNÁMKA: Na označenie hranice medzi celým číslom a zlomkovými časťami desatinnej číslice sa v celom tomto dokumente namiesto desatinnej čiarky vždy používa bodka. Na oddelenie tisícov sa nepoužívajú žiadne znaky.

Súhrn informácií o bezpečnosti a výkone nájdete tu:

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

SYMBOLY

Spoločnosť Ventana používa okrem symbolov a značiek uvedených v norme ISO 15223-1 aj nasledujúce symboly a značky (definície používaných značiek v USA: pozri dialog.roche.com):



Globálne číslo obchodnej položky



Jedinečná identifikácia pomôcky



Označuje subjekt, ktorý importoval zdravotnícku pomôcku do Európskej únie

DUŠEVNÉ VLASTNÍCTVO

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* a logo VENTANA sú ochranné známky spoločnosti Roche. Všetky ostatné ochranné známky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÉ ÚDAJE



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

www.roche.com



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

