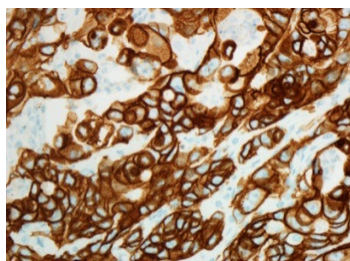


VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493

05999570001

IVD  50



Obr. 1. VENTANA anti-HER2/neu (4B5)
3+ k barvení při karcinomu žaludku

URČENÉ POUŽITÍ

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) je protilátka určená k semikvantitativní detekci antigenu HER2 ve formaliněm fixovaných a v parafínu zalitých řezech normálních a neoplastických tkání prsu a žaludku na barvicím automatu pro IHC/ISH společnosti VENTANA.

Indikuje se jako pomůcka při posuzování stavu rakoviny prsu a žaludku u pacientů, u nichž se zvažuje

léčba přípravkem Herceptin, a stavu rakoviny prsu u pacientů, u nichž se zvažuje léčba přípravkem Kadcyca (trastuzumab emtansin) nebo Perjeta (pertuzumab).

Hodnocení musí provádět kvalifikovaný patolog, který přitom musí vzít v úvahu výsledky histologického vyšetření, příslušné klinické informace a patřičné kontroly.

Protilátka je určena k diagnostice *in vitro*.

SOUHRN A VÝKLAD

VENTANA HER2 (4B5) je králičí monoklonální protilátka (klon 4B5) zaměřená proti interní doméně onkoproteinu c-erbB-2 (HER2). Onkoprotein c-erbB-2 naklonoval a popsal v roce 1986 Akiyama a kol.¹ Jedná se o transmembránový glykoprotein o přibližné molekulové hmotnosti 185 kD, který se svou strukturou podobá receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tento protein je spojen s tyrosinkinázovou aktivitou, která je podobná jako u mnohých receptorů růstových faktorů a u proteinů rodiny src mající transformující aktivitu. Kódující sekvence odpovídá extracelulární vazebné doméně a intracelulární kinázové doméně. To naznačuje, že HER2 může být zapojen v signální transdukcii a stimulaci mitogenní aktivity.¹

Bylo zjištěno, že klon 4B5 reaguje při metodě Western blot s proteinem 185 kD z lyzátu buněk SK-BR-3. Linie SK-BR-3 je buněčná linie karcinomu prsu, která má 128 násobně zvýšenou expresi mRNA proteinu HER2.² Velikost identifikovaného pásma dobře koreluje s velikostí pásma uváděného pro protein HER2 (185 kD).¹ Imunohistochemické experimenty s transfekovanými buněčnými liniemi (HEK293) prokázaly, že protilátka klon 4B5 barví buňky transfekované HER2 a buňky transfekované HER4. U buněk transfekovaných HER1 nebo HER3 nebylo pozorováno žádné obarvení. Z údajů metody Western blot s rekombinantním proteinem HER4 také vyplývá, že protilátka klon 4B5 rozpoznává epitop HER4.

U karcinomu prsu je protein HER2 exprimován na hladině detekovatelné imunohistochemickými metodami až u 20 % adenokarcinomů z různých míst. Na HER2 je pozitivních 15 – 30 % invazivních ductálních karcinomů.³ Pozitivní jsou téměř všechny případy Pagetovy nemoci prsu⁴ a až 90 % případů ductálního karcinomu *in situ* komedonového typu.³ U karcinomu žaludku je protein HER2 exprimován na hladině detekovatelné imunohistochemickými metodami až u 30 % případů střevního typu, u 15 % případů smíšeného typu a 5 % karcinomů žaludku difúzního typu. Imunohistochemická detekce zvýšené exprese proteinu HER2 se rovněž používá jako pomůcka při určování pacientů, u nichž je indikována cílená terapie pomocí HER2.^{5,31-35}

Společnost Ventana hodnotila výsledky barvení protilátkou klon 4B5 u normálních tkání, neoplastických tkání a 322 případů karcinomu prsu. V normálních testovaných tkáních byla exprese v souladu s publikovanou literaturou, kde se neobjevilo žádné neočekávané specifické cytoplazmatické/membránové zbarvení, s výjimkou dvou případů mandlí, kdy se projevilo membránové zbarvení epitelálních buněk, jednoho případu příštítné žlázy a jednoho případu epitelu jícnu. Mezi testovanými neoplastickými tkáněmi se objevilo cytoplazmatické/membránové zbarvení v buňkách rakoviny prsu, tračníku a vaječníku. V jedné srovnávací studii s PATHWAY HER-2/neu (CB11) bylo pomocí protilátky klon 4B5 hodnoceno tři sta dvacet dva (322) karcinomů prsu. Mezi

těmito dvěma testy byla prokázána významná korelace. Další informace naleznete v části Souhrn očekávaných výsledků. Další informace o protilátce klon 4B5 viz Literatura.²⁴⁻³⁰

Použitím již naředěné protilátky VENTANA HER2 (4B5) a souprav iVIEW DAB Detection Kit a *ultraView* Universal DAB Detection Kit připravených k použití, v kombinaci s barvicím automatem IHC/ISH společnosti VENTANA, se snižuje možnost lidské chyby a nevyhnutelné variability, k nimž dochází během ředění jednotlivých reagensů, ručního pipetování a ručního dávkování reagensů.

KLINICKÝ VÝZNAM

Rakovina prsu je nejčastější karcinom vyskytující se u žen a je druhou nejčastější příčinou úmrtí v souvislosti s rakovinou. V Severní Americe je onemocnění žen karcinomem prsu s pravděpodobností jedné ku osmi.⁶ Celkové přežití může významně ovlivnit včasná detekce a vhodná léčba.⁷ Karcinom žaludku je čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním a celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí na karcinom. Nejběžnější léčbou karcinomu žaludku je chirurgický zákrok. Většina případů karcinomu žaludku je však zjištěna až v pokročilém stadiu a operace je často obtížná. K léčbě pokročilých případů karcinomu žaludku se používá chemoterapie, míra přežití pacientů s karcinomem je však velmi nízká. V rutinní imunohistochemii (IHC) lze snadno používat malé vzorky tkání, díky čemuž se z této metody při použití protilátek, jež detekují antigeny významné pro interpretaci karcinomu, stává účinný nástroj pro patology při stanovování diagnózy a prognózy onemocnění. Jedním z důležitých markerů karcinomu prsu a žaludku je v současnosti onkoprotein c-erbB-2 (HER2).

HER2 je transmembránový protein,⁸ který je spřízněný s EGFR a podobně jako EGFR vykazuje tyrosinkinázovou aktivitu.¹ U řady nádorů, včetně karcinomu prsu a žaludku, byla zjištěna genová amplifikace a odpovídající nadměrná exprese c-erbB-2.^{8,9}

Ukázalo se, že některým pacientům s karcinomem prsu nebo žaludku může pomoci léčba cílená na HER2. Léčba cílená na HER2 je účinná pouze u pacientů s karcinomem prsu nebo žaludku pozitivním na HER2. *In vitro* diagnostika s cílem zjištění stavu HER2 u karcinomu prsu nebo žaludku je pro klinické pracovníky důležitou pomůckou při stanovení, pro které pacienty je terapie cílená na HER2 vhodná.

Interpretace výsledků jakéhokoli systému detekce HER2 musí zohlednit skutečnost, že HER2 je exprimován jak v nádorových buňkách karcinomu prsu nebo žaludku, tak ve zdravé tkáni, i když v různých hladinách a s různými vzory exprese.¹⁰ Histologické tkáňové preparáty mají tu výhodu, že je morfologie tkání neporušená, což usnadňuje interpretaci pozitivní vzorku na HER2.

PRINCIPY METODY

VENTANA HER2 (4B5) je králičí monoklonální protilátka, která se váže na HER2 v tkáňových řezech zalitých do parafínu. Tato specifická protilátka může být lokalizována buď přípravkem s biotinem konjugovanou sekundární protilátkou, která dokáže rozpoznat králičí imunoglobuliny, a následným přidáním konjugátu streptavidinu s křenuovou peroxidázou (HRP) (iVIEW DAB Detection Kit), nebo konjugátem sekundární HRP protilátky (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). Specifický komplex protilátky a enzymu je vizualizován srážejícím se produktem reakce s enzymem. Každý krok zahrnuje inkubaci po přesně stanovenou dobu při přesně stanovené teplotě. Na konci každého inkubačního kroku barvicí automat VENTANA IHC/ISH řezy promyje, aby se reakce zastavila a odstranil se nenavázaný materiál, který by v dalších krocích požadované reakci bránil. Automat rovněž přidá roztok k zakrytí sklíčka Liquid Coverslip, který minimalizuje odpařování vodných reagensů z preparátu.

Klinické případy je třeba hodnotit s ohledem na výsledek příslušných kontrol. Společnost Ventana doporučuje začlenit pozitivní kontrolní tkáň fixovanou a zpracovanou stejným způsobem jako vzorky pacientů (například slabě pozitivní karcinom prsu nebo žaludku). Vedle barvení protilátkou VENTANA HER2 (4B5) by se měl druhý preparát barvit protilátkou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby mohl být test považován za platný, musí tkáň pro pozitivní kontrolu vykazat membránové zbarvení nádorových buněk. Při barvení pomocí CONFIRM Negative Control Rabbit Ig mají být tyto komponenty negativní. Dále se doporučuje, aby každá zpracovávaná dávka vzorků barvená na automatu společnosti VENTANA zahrnovala preparát s negativní kontrolní tkání (například karcinom prsu nebo žaludku negativní na HER2). Tato negativní kontrolní tkáň by se měla barvit protilátkou VENTANA HER2 (4B5), aby bylo zajištěno, že zesílení antigenu ani jiné postupy předběžné úpravy nevedly k falešně pozitivnímu obarvení.

DODANÁ REAGENCIE

Dávkač VENTANA HER2 (4B5) obsahuje množství reagensie postačující na 50 testů. Jeden 5ml dávkač VENTANA HER2 (4B5) obsahuje přibližně 30 µg králičí monoklonální protilátky nasměrované proti lidskému antigenu c-erbB-2.

Protilátka je naředěna ve fyziologickém roztoku pufovaném 0,05 M Tris obsahujícím 0,01 M EDTA, 0,05 % Brij-35 s 0,3 % proteinového nosiče a 0,05 % azidu sodného jako konzervační látky. Ze zásobního roztoku je zde přítomno stopové množství – asi 0,25 % fetálního telecího séra.

Celková koncentrace proteinu v reagentii je přibližně 16 mg/ml. Koncentrace specifické protilátky činí přibližně 6 µg/ml. VENTANA HER2 (4B5) je králičí IgG naředěný ze supernatantů tkáňových kultur.

Podrobné popisy naleznete v příbalové informaci k příslušné detekční soupravě VENTANA:

- (1) Princip metody, (2) Potřebný materiál a reagentie, které nejsou součástí dodávky, (3) Odběr vzorků a příprava pro analýzu, (4) Postup řízení jakosti, (5) Řešení problémů, (6) Interpretace výsledků a (7) Obecná omezení.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Součástí dodávky nejsou barvicí reagentie, jako jsou detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně negativních a pozitivních kontrolních tkáňových preparátů.

Ve všech zeměpisných oblastech nemusejí být všechny produkty uvedené v příbalové informaci dostupné. Obrátte se na své místní servisní zastoupení.

UCHOVÁVÁNÍ

Uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C. Chraňte před mrazem.

K zajištění správného nadávkování reagentie a stability protilátky po každém cyklu je nutno dávkovač uzavřít víčkem a okamžitě uložit ve vodorovné poloze do chladničky. Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentie nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA v barvicích automatech VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované ve formalinu a zalité v parafinu. Doporučeným fixativem je 10 % neutrální pufovaný formalin.²

Řezy pro podložní skla by měly být řezány přibližně na tloušťku 4 µm. Sklička by měla být Superfrost Plus nebo ekvivalentní. Studie provedené ve společnosti Ventana ukazují, že tkáňové řezy vysušené na vzduchu a řezy buněčných linií uchovávané při teplotě 2 – 8 °C jsou stabilní nejméně 6 měsíců. Každá laboratoř by si měla sama ověřit stabilitu tkáňových řezů u svých postupů a podmínek skladování.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

4. K diagnostice *in vitro* (IVD).
5. Použití tohoto produktu k výběru pacientů ro léčbu přípravkem Kadcyla nebo Perjeta nemusí být ve všech zeměpisných oblastech k dispozici. Dostupnost ve vašem konkrétním místě si ověřte u místního zastoupení firmy Roche.
6. Zabraňte kontaktu reagentií s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
7. S materiály lidského nebo zvířecího původu je nutno zacházet jako s biologicky nebezpečnými materiály a likvidovat je v souladu s příslušnými předpisy.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentií, mohla by způsobit nesprávné výsledky.
9. Při dodržení návodu k použití není tento výrobek klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervačním prostředkem v reagentii je azid sodný. Symptomy nadměrné expozice azidem sodným zahrnují podráždění kůže a očí a podráždění sliznic a horních cest dýchacích. Koncentrace azidu sodného ve výrobku je 0,05 % a nenaplní tak kritéria OSHA pro nebezpečnou látku. Usazeniny NaN₃ mohou reagovat s olovem a mědí v potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů v potrubí.¹² U citlivých jedinců se mohou projevit systémové alergické reakce.
10. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
11. Blíže informace naleznete v bezpečnostním listě výrobku.

POSTUP BARVENÍ

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty k použití v barvicích automatech VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Doporučené barvicí protokoly jsou uvedeny v Tabulka 1 a Tabulka 2.

Tato protilátka byla optimalizována pro uváděné inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagentie ověřit.

Parametry automatizovaných postupů lze zobrazovat, tisknout a upravovat postupem uvedeným v návodu k obsluze přístroje. Další podrobné informace o postupech

imunohistochemického barvení naleznete v příbalové informaci k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Tabulka 1. Doporučený barvicí protokol pro VENTANA HER2 (4B5) s VIEW DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Typ postupu	Metoda		
	Přístroj BenchMark a BenchMark GX	Přístroj BenchMark XT	Přístroj BenchMark ULTRA
Odstaňování parafinu	Zvolená	Zvolená	Zvolená
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, standardní	Cell Conditioning 1, standardní	ULTRA CC1, mírné
Protilátka (primární)	32 minut, 37 °C	32 minut, 37 °C	24 minut, 36 °C
A/B Blok (blokování biotinu)	Nezvolená	Zvolená	Zvolená
Kontrastní barvivo (Hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	Bluing, 4 minuty	Bluing, 4 minuty

Tabulka 2. Doporučený barvicí protokol pro VENTANA HER2 (4B5) s detekční soupravou ultraView DAB na přístrojích BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Typ postupu	Metoda	
	Přístroje BenchMark, BenchMark GX a BenchMark XT	Přístroj BenchMark ULTRA
Odstaňování parafinu	Zvolená	Zvolená
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, mírná	ULTRA CC1, mírná
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
ultraWash	Zvolená	Zvolená
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	Bluing, 4 minuty

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Systémové kontrolní buněčné linie

Společnost Ventana dodává jako samostatný výrobek čtyři formalinové fixované kontrolní buněčné linie zalité do parafinu, napeřené a uložené na jednom společném skličku. K předběžnému ověření zpracovací metody používané pro barvení preparátů protilátkou VENTANA HER2 (4B5) mohou být vhodné kontrolní preparáty PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (kat. č. 781-2991). Tyto čtyři kontrolní buněčné linie byly charakterizované hybridizací *in situ* na počet genových kopií. Pokud se buněčné linie správně zpracují a obarví, mají se zbarvit tak, jak je popsáno v tabulce 4. Jestliže indikované zbarvení není v příslušných jádrech zjevné, zejména u kontrol 1+ a 2+, je třeba barvení tkání zopakovat.

Tabulka 3. Charakteristiky kontrolních preparátů PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides

Skóre HER2 IHC	Buněčná linie	Poměr HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1,11
1+	T47D	1,12
2+	MDA-MB-453	2,66
3+	BT-474	5,53

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

Tkáň pro pozitivní kontrolu

Pro každý soubor zkušebních podmínek a při každém barvení protilátkou VENTANA HER2 (4B5) je třeba analyzovat tkáň pro pozitivní kontrolu, fixovanou a zpracovanou stejným způsobem, jako vzorky pacientů. Tkáň může obsahovat jak pozitivně se barvící buňky nebo součásti tkáně, tak negativní součásti buněčné tkáně, a sloužit jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní vzorky by měly být čerstvě fixované vzorky z pitvy, biopsie nebo operace, zpracované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované řezy. Tyto řezy mohou sloužit ke sledování všech kroků analýzy, od přípravy tkáně až po její barvení. Tkáňové řezy fixované nebo zpracované jiným postupem než testovaný vzorek mohou sloužit ke kontrole všech reagentů a kroků metody kromě fixace a zpracování tkáně. Pro optimální kontrolu kvality a zjištění nižších úrovní degradace reagentů je vhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením než se silným pozitivním zbarvením. Nejvhodnější je zvolit tkáň, o níž je známo, že poskytuje slabé, ale pozitivní barvení, aby byla zajištěna citlivost systému na slabou degradaci reagentů nebo problémy s imunohistochemickou metodikou. Obecně však neoplastická tkáň, která je pozitivní na HER2, bývá v důsledku povahy patologie (nadměrné exprese) silně pozitivní. Příkladem pozitivní kontroly pro HER2 (4B5) je známý vzorek invazivního karcinomu prsu slabě pozitivní na HER2 nebo slabě pozitivní vzorek karcinomu žaludku. Pozitivně se zbarvující tkáňové složky (membránové barvení neoplastických buněk) se používají k potvrzení použití protilátky a správné funkce přístroje.

Známe pozitivní tkáňové kontroly se mají používat pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testových reagentů, nikoliv jako pomůcka při stanovování konkrétní diagnózy vzorků pacientů.

Tkáň pro negativní kontrolu

Jako negativní tkáňovou kontrolu lze použít též preparát, který se používá pro pozitivní tkáňovou kontrolu (duktální nebo lobulární invazivní karcinom prsu nebo karcinom žaludku). Nezbarvující se součásti (okolní stroma, lymfoidní buňky a cévy) by měly prokázat absenci specifického zbarvení a ukázat specifické (falešné pozitivní) zbarvení pozadí s primární protilátkou. Použijte známou negativní tkáň, zpracovanou a zalitou stejným způsobem jako vzorky pacientů.

Negativní reagenční kontrola

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s negativní reagenční kontrolou. Negativní reagenční kontrola místo primární protilátky slouží k vyhodnocení nespecifického zbarvení. Preparát by se měl barvit protilátkou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubační doba negativní reagenční kontroly by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách oznamte neprodleně pracovníkovi vašeho místního zastoupení. Pokud výsledky kontrol nevyhovují specifikacím, jsou výsledky pacienta neplatné. Viz část Řešení problémů v této příbalové informaci. Zjistěte problém a zjednejte nápravu; potom analýzu vzorků pacientů zopakujte.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího přístroje v diagnostické proceduře by měla být ověřena specifita protilátky testováním na řadě dostupných tkání se známými imunohistochemickými účinky, které představují známé pozitivní a negativní tkáně (prostudujte si Postupy kontroly kvality popsané výše v této části příbalové informace a požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,¹³ nebo schválenou směrnici CLSI¹⁴ nebo oba dokumenty). Tyto postupy kontroly kvality musejí být provedeny vždy, když se změní šarže protilátky nebo když se změní parametry testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně karcinomu prsu a žaludku, u nichž je znám status HER2.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Při automatizovaném postupu imunologického barvení VENTANA vzniká hnedě zbarvený reakční produkt (DAB), který se vysráží v místech s antigenem, nalezených pomocí VENTANA HER2 (4B5). Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog se zkušenostmi s imunohistochemickými postupy vyhodnotit kontroly a kvalitu barevných produktů.

Pozitivní kontroly

Nejprve je nutné otestovat obarvenou pozitivní tkáňovou kontrolu k ověření správnosti funkce všech reagentů. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu uvnitř membrány cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. V závislosti na délce inkubační doby a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvení bleďmodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může správnou interpretaci výsledků narušit.

Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

K ověření specifického značení cílového antigenu primární protilátkou je třeba po tkání pro pozitivní kontrolu otestovat tkáň pro negativní kontrolu. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkřížené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Pokud se ve tkáni pro negativní kontrolu projeví specifické zbarvení, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Negativní reagenční kontroly

Nespecifické zbarvení, pokud je přítomné, je většinou difúzní. V řezech z tkání nadměrně fixovaných formalinem se může také objevit sporadické slabé zbarvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků používejte pouze intaktní buňky, jelikož nekrotické nebo degenerované buňky mohou často barvit nespecificky.

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta se vyšetřují jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je třeba hodnotit s ohledem na případné zbarvení pozadí negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek pouze to, že příslušný antigen nebyl detekován, nikoli, že není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen. Ke správné interpretaci každého imunohistochemického výsledku je třeba také pomoci řezů barvených hematoxylinem a eozinem zkoumat morfolologii každého tkáňového vzorku. Pacientovy morfologické nálezy a příslušné klinické údaje musí interpretovat kvalifikovaný patolog.

INTERPRETACE ZBARVENÍ

Konvence pro vyhodnocování výsledků při interpretaci barvení protilátkou VENTANA HER2 (4B5) u karcinomu prsu

Karcinomy prsu, které se pokládají za pozitivní na zvýšenou expresi proteinu HER2, musejí splňovat prahová kritéria intenzity obarvení (2+ nebo vyšší na stupnici od 0 do 3+) a procentuálního podílu pozitivních nádorových buněk (více než 10 %). Zbarvení se musí nacházet také na buněčné membráně. Cytoplazmatické zbarvení může být také přítomno, ve stanovení pozitivity však není zahrnuto. Prohlédněte celý tkáňový řez, aby bylo zaručeno, že se budou vyhodnocovat pouze dobře zachovalé a dobře zbarvené oblasti. Zbarvení, které zcela obklopuje cytoplazmatickou membránu, se hodnotí stupněm intenzity „2+“ nebo „3+“. Částečné zbarvení membrány se hodnotí stupněm „1+“. Mezní případy může být nutno pro rozlišení mezi intenzitami „1+“ a „2+“ vyšetřit při 40násobném nebo vyšším zvětšení. Oproti případům hodnoceným intenzitou 3+ má zbarvení o intenzitě 2+ ostřejší a jasnější vyznačený kruh, zatímco případy vyhodnocené jako 3+ vykazují velmi silnou konturu. Kritéria barvení pro rychlou orientaci jsou uvedena níže v tabulce. Podrobnější popis a fotografie zbarvení získaného pomocí protilátky VENTANA HER2 (4B5) naleznete v příručce *Interpretační příručka pro barvení VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody při karcinomu prsu a žaludku*.

Tabulka 4. Kritéria intenzity a vzoru obarvení buněčné membrány protilátkou VENTANA HER2 (4B5) u karcinomu prsu

Vzor zbarvení	Skóre (hlášené ošetřujícím lékařem)	Hodnocení obarvení HER2
Nebylo pozorováno žádné membránové zbarvení	0	Negativní
Bledé, částečné obarvení membrány u jakéhokoli podílu rakovinových buněk	1+	Negativní
Slabé celkové zbarvení membrány, více než 10 % rakovinových buněk	2+	Nejednoznačné*
Intenzivní celkové zbarvení membrány, více než 10 % rakovinových buněk	3+	Pozitivní

*Doporučena reflexní hybridizace in situ (ISH)

Konvence pro vyhodnocování výsledků při interpretaci barvení protilátkou VENTANA HER2 (4B5) u karcinomu žaludku

Karcinomy žaludku, které se považují za pozitivní na zvýšenou expresi proteinu HER2, musejí splňovat prahová kritéria intenzity a vzoru obarvení membrány (2+ nebo více na stupnici od 0 do 3+) a procentuálního podílu pozitivních nádorových buněk. Zbarvení se musí lokalizovat na buněčné membráně, ale nemusí být zcela obvodové, protože je pravidelně pozorováno bazolaterální zbarvení, které by se při vyhodnocení výsledků mělo zohlednit. Může dojít ke zbarvení cytoplazmy a/nebo jádra, toto zbarvení se však při určování pozitivnosti nebere v úvahu. U karcinomu žaludku závisí procento pozitivních nádorových buněk na tom, zda se jedná o vzorek z biopsie (≥ 5 kohezních buněk) nebo z resekce (≥ 10 %).

V rámci pokynů pro vyhodnocení výsledků pro imunohistochemické testy na HER2 u karcinomu žaludku¹⁵ je nutno upozornit, že i když je silné zbarvení membrán známkou zvýšené exprese proteinu HER2 v neoplastických buňkách, nemusí být zcela obvodové.

Rüschoff a kol. popsali u karcinomu žaludku difúzní zbarvení cytoplazmy s obarvením jádra i bez něj.¹⁶ Při určení exprese proteinu HER2 u karcinomu žaludku by se mělo používat pouze zbarvení membrán.

Imunohistochemické barvení protilátkou klon 4B5 může vést k obarvení cytoplazmy i jader normální žaludeční sliznice a vzácněji u neoplastických buněk karcinomu žaludku a karcinomu žaludku/jícnu. Povaha tohoto obarvení cytoplazmy a jader není dosud známa. Tento vzor obarvení by se neměl zaměňovat s diskretním obarvením membrány, které je známkou pozitivnosti na HER2 u neoplastických buněk.

Podrobnější popis a fotografie zbarvení získaného pomocí protilátky VENTANA HER2 (4B5) naleznete v příručce *Interpretační příručka pro barvení VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody při karcinomu prsu a žaludku*.

Tabulka 5. Kritéria intenzity a vzoru obarvení buněčné membrány protilátkou VENTANA HER2 (4B5) u karcinomu žaludku

Vzor obarvení – vzorek z resekce	Vzor obarvení – vzorek z biopsie	Skóre (hlášené lékařem, který si vyžádal test)	Hodnocení obarvení HER2
Žádná reaktivita <u>nebo</u> reaktivita membrán u <10 % nádorových buněk	Žádná reaktivita nebo reaktivita membrán u všech nádorových buněk	0	Negativní
Bledá/sotva patrná reaktivita membrán u ≥ 10 % nádorových buněk; buňky jsou reaktivní pouze v části svých membrán	Shluk nádorových buněk* s bledou/sotva patrnou reaktivitou membrán bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	1+	Negativní
Slabá až střední úplná, bazolaterální nebo laterální reaktivita membrán u ≥ 10 % nádorových buněk	Shluk nádorových buněk se slabou až střední úplnou, bazolaterální nebo laterální reaktivitou membrán bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	2+	Nejednoznačné**
Silná úplná, bazolaterální nebo laterální reaktivita membrán u ≥ 10 % nádorových buněk	Shluk nádorových buněk se silnou úplnou, bazolaterální nebo laterální reaktivitou membrán bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	3+	Pozitivní

* ≥ 5 kohezních buněk

** Doporučena reflexní hybridizace in situ (ISH)

OMEZENÍ

Všeobecná omezení

- Imunohistochemie je vícestupňový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentů a tkání, ve fixaci a zpracování, v přípravě imunohistochemického preparátu a v interpretaci výsledků zbarvení.
- Zbarvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, oplach, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, zachytu protilátky nebo k falešně negativním výsledkům. V důsledku odchylek při fixaci a metodách zalévání či následkem stávajících nerovnoměrností ve tkáni mohou být výsledky nekonzistentní.
- Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
- Klinickou interpretaci případného pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti je třeba provádět s ohledem na klinickou historii, morfolonii a další histopatologická kritéria. Klinickou interpretaci pozorovaného nebo naopak nezjištěného zbarvení je vždy třeba doplnit morfolickým vyšetřením a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Je věcí kvalifikovaného patologa, aby byl dobře obeznámen s protilátkami, reagenty a metodami používanými při interpretaci barveného preparátu. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení obarvených preparátů a vhodnost používaných pozitivních a negativních kontrol.
- Společnost Ventana dodává protilátky a reagenty, které jsou pro použití optimálně nařaděné, pokud jsou dodrženy pokyny, které jsou součástí produktu. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může vést k tomu, že očekávané výsledky budou neplatné. Je nutno používat a dokumentovat příslušné

- kontroly. Uživatel, který se od doporučených postupů odchýlí, musí na sebe vzít odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.
17. Tento výrobek není určen pro průtokovou cytometrii, charakteristiky účinnosti zatím nejsou známy.
 18. U tkání, které nebyly předem testovány, mohou reagencie vykazovat neočekávané reakce. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmě nebo jiných patologických tkáních nelze dokonce zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí ani v testovaných skupinách tkání.¹⁷ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
 19. Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.¹⁸
 20. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) a aktivitou endogenní peroxidázy (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu použitého imunohistochemického barviva.¹⁹
 21. Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek pouze to, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

1. Protílátka musí být optimalizována, jak je pro platformy a detekční materiály společnosti VENTANA uvedeno v tabulkách 1 a 2. Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být zapotřebí zvýšit nebo snížit na jednotlivých vzorcích inkubační dobu primární protílátka. Další informace o proměnných fixace naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“.²⁰
2. Protílátka ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežívá v běžným způsobem zpracované a nazezané tkáni, fixované ve formalinu. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, nesou odpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
3. Na specifitu byla testována kostní dřeň. Dříve než budou interpretovány výsledky zbarvení, musí uživatel stanovit příslušné zbarvení ve tkáních.
4. Imunohistochemické barvení protilátkou klon 4B5 může vést k obarvení cytoplazmy i jader u normální žlučové sliznice a vzácněji u neoplastických buněk karcinomu žaludku a karcinomu žaludku/jícnu. Povahy tohoto obarvení cytoplazmy a jader není dosud známa. Tento vzor obarvení se nesmí zaměňovat s diskretním obarvením membrány, které je u neoplastických buněk známkou pozitivní na HER2.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Funkce protílátka VENTANA HER2 (4B5) byla hodnocena na základě studií specifity, reprodukovatelnosti a porovnání metod. Veškeré barvení probíhalo podle výše uvedeného protokolu detekční soupravy VEW DAB Detection Kit na barvicím automatu Benchmark XT, pokud není uvedeno jinak. Nejprve jsou uvedeny údaje pro karcinom prsu a poté pro karcinom žaludku.

1. Specifita: Specifita protílátka klon 4B5 byla stanovena ve studii, která u většiny normálních tkání nevykázala žádné specifické obarvení membrán. Výsledky byly následující: nadledvina (0/3), prs (0/3), malý mozek (0/3), mozek (0/3), děložní hrdlo (0/3), tračník (0/3), jícen (1/3), srdce (0/2), ledvina (0/3), játra (0/3), plíce (0/3), mesoteliální buňky (0/3), vaječník (0/3), slinivka břišní (0/3), příštítná žláza (1/3, fokální membránové zbarvení), periferní nerv (1/3), hypofýza (0/2), prostata (1/3), slinná žláza (0/3), skeletální sval (0/3), kůže (0/3), tenké střevo (0/3), slezina (0/3), žaludek (0/3), varlata (0/3), brzlík (0/2), štítná žláza (0/3), mandle (2/3 fokální zbarvení epitelálních buněk povrchu) a děloha (0/3).
Specifita protílátka klon 4B5 byla stanovena také ve studii, která u většiny neoplastických tkání nevykázala žádné specifické obarvení membrán. Výsledky byly následující: rakovina prsu (1/4), karcinoid (0/2), rakovina tračníku (1/3), hepatocelulární rakovina (0/5), leiomyom (0/2), rakovina plic (0/2), lymfom (0/3), melanom (0/2), rakovina vaječníku (1/2), rakovina slinivky břišní (0/3), rakovina prostaty (0/3), rakovina renálních buněk (0/5), sarkom (0/2), rakovina žaludku (0/3), rakovina štítné žlázy (0/3) a nediferencovaná rakovina (0/1).
Pozitivní obarvení epitelu mandlí, jícnu, prostaty, periferního nervu, příštítného tělíska, karcinomu prsu, tlustého střeva a karcinomu vaječníku je shodné s výsledky uváděnými v dostupné odborné literatuře pojednávající o expresi HER2.
2. Senzitivita: senzitivitu ukazují tabulky 9 a 11: Konsenzuální imunohistochemická (IHC) skóre protílátka klon 4B5 od tří patologů v porovnání s metodou FISH.

3. Reprodukovatelnost barvení v rámci cyklu na barvicích platformách přístrojů BenchMark a BenchMark XT byla stanovena metodou barvení po třech preparátech z pěti tkání karcinomu prsu, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+, a 3+. U každého případu se v rámci cyklu a na všech testovaných platformách správně zbarvily tři preparáty ze 3. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků v rámci jednoho cyklu barvením různých setů sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jednom cyklu.
4. Reprodukovatelnost barvení mezi cykly a mezi platformami byla stanovena metodou barvení po třech preparátech z pěti tkání karcinomu prsu, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+, a 3+, ve třech různých cyklech na platformách přístrojů BenchMark a BenchMark XT. U každého případu se ve všech třech cyklech a na všech testovaných platformách správně zbarvilo devět preparátů z 9.
5. Reprodukovatelnost barvení mezi laboratořemi a reprodukovatelnost vyhodnocování výsledků mezi odečitateli na přístroji BenchMark XT: Do studie mezilaboratorní reprodukovatelnosti se zapojily tři laboratoře. Na každé pracovišti byly k barvení na automatickém barvicím přístroji VENTANA BenchMark XT podle doporučeného barvicího protokolu odeslány preparáty ze 40 případů invazivního karcinomu prsu, fixované v neutrálním pufovaném formalinu [Vždy 10 z každé kategorie HER2 (0-1+, 2+, 3+)] a šest (6) kontrolních preparátů PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides. Kontroly zahrnovaly kontrolní preparáty PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhý preparát barvený negativní Ig reagentem. Posuzováno podle kontrol nemělo žádné pracoviště žádný neplatný cyklus. Výsledky analyzovala společnost Ventana. Třicet čtyř preparátů ze čtyřiceti (34/40) vykazovaly na všech pracovištích podobnou intenzitu zbarvení. Šest případů (6/40 nebo 15 %) se lišilo maximálně o jednu úroveň. Tři (3/6) vzorky se lišily mezi 0 a 1+, což bylo v obou případech považováno za negativní. Dva vzorky (2/40 čili 5 %) se lišily mezi 2+ a 3+ a jeden vzorek (1/40) ležel v rozmezí od 1+ do 2+.
6. Reprodukovatelnost vyhodnocení výsledků mezi odečitateli na přístroji BenchMark XT: U všech čtyřiceti případů (100 %) se na hodnocení shodli minimálně 2 ze 3 patologů.
7. Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla stanovena metodou automatizovaného barvení 5 tkání z karcinomu prsu, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+ a 3+, za použití 3 šarží protílátka HER2 (4B5). Obarvené tkáně byly hodnoceny třemi kvalifikovanými hodnotiteli stupnicí 0 až 3+. Mezi hodnotiteli bylo dosaženo 100 % shody mezi šaržemi pro 3 preparáty a 5 obarvených tkání.
8. Srovnávací studie mezi králičí monoklonální protilátkou klon 4B5 a myší monoklonální protilátkou PATHWAY HER-2/neu (CB11): Souhrn z provedených studií. Srovnávací studie metod byla provedena za účelem zjištění vzájemného vztahu mezi protilátkou klon 4B5 a protilátkami PATHWAY HER-2/neu (CB11) a PathVysion Her-2 FISH, což jsou diagnostické testy schválené FDA. Studie se účastnilo šest hodnotitelů. Dvě skupiny tří hodnotitelů hodnotily dvě nezávislé skupiny (skupina 1: n = 178, skupina 2: n = 144), za použití známých případů karcinomu prsu barvených pomocí PATHWAY HER-2/neu (CB11) a klon 4B5. Údaje FISH byly získány z anamnézy pacientů. U každého případu bylo pro každou protílátku stanoveno konsenzuální skóre od tří odečitatelů za účelem omezení variability mezi odečitateli, která je popsána u vyhodnocení výsledků HER2.^{21,22,23} Byly hodnoceny celkem 322 případy. Preparáty barvené pomocí PATHWAY HER-2/neu (CB11) byly zpracovány a obarveny podle návodu výrobce uvedeného v příbalové informaci k tomuto přípravku. Hodnocení preparátů barvených pomocí PATHWAY HER-2/neu (CB11) bylo provedeno v rozmezí asi jednoho roku od barvení. Jelikož skóre od jednoho z šesti odečitatelů byla mimo interval spolehlivosti, jsou data z obou skupin prezentována takto:

Reprodukovatelnost vzorků ze srovnávacích studií mezi jednotlivými patologi

Tabulka 6. Skupina 1: Konsenzuální imunohistochemická (IHC) skóre od tří patologů

Skóre protílátka klon 4B5	Skóre protílátka PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Celkem	31	37	75	143

Skupina 1: Funkční charakteristiky pro prezentaci 3 x 3.

Celková shoda je 29 + 13 + 53/143 = 66,4 % (95 % interval spolehlivosti = 38,6 %, 59,7 %).

Skupina 1: Funkční charakteristiky pro prezentaci 2 x 2 [pozitivní (2+ a 3+) a negativní skóre (0+ a 1+) protilátky HER-2 jsou sdružena].

- Pozitivní procentuální shoda je $29 + 2 + 24 + 13/31 + 37 = 100\%$ (95 % interval spolehlivosti = 97,5 % – 100 %).
- Negativní procentuální shoda je $53/75 = 70,7\%$ (95 % interval spolehlivosti = 58,5 % – 80,1 %)

Celková shoda je $29 + 24 + 2 + 13 + 53/143 = 84,7\%$ (95 % interval spolehlivosti = 78,2 % – 90,0 %).

Tabulka 7. Skupina 2: Konsenzuální imunohistochemická (IHC) skóre od tří patologů

Skóre protilátky klon 4B5	Skóre protilátky PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Celkem	73	20	85	178

Skupina 2: Funkční charakteristiky pro prezentaci 3 x 3.

Celková shoda je $72 + 12 + 80/178 = 92,1\%$ (95 % interval spolehlivosti = 80,1 %, 93,1 %).

Skupina 2: Funkční charakteristiky pro prezentaci 2 x 2 [pozitivní (2+ a 3+) a negativní skóre (0+ a 1+) protilátky HER2 jsou sdružena].

- Pozitivní procentuální shoda je $72 + 12 + 1 + 1/73 + 20 = 92,5\%$ (95 % interval spolehlivosti = 85,2 % – 96,9 %).
- Negativní procentuální shoda je $80/85 = 94,1\%$ (95 % interval spolehlivosti = 86,8 % – 98,1 %)

Celková shoda je $72 + 12 + 1 + 1 + 80/178 = 93,3\%$ (95 % interval spolehlivosti = 88,5 % – 96,4 %).

Tabulka 8. Skupina 1: Konsenzuální IHC hodnocení PATHWAY HER-2/neu (CB11) tří patologů oproti FISH.

Skóre protilátky PATHWAY HER-2/neu (CB11)	Výsledek metody FISH		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Celkem	86	58	144

Skupina 1: Charakteristiky účinnosti pro PATHWAY HER-2/NEU (CB11) a FISH, prezentace 2 x 2 (kde hodnocení 2 a 3 jsou považována za pozitivní)

- Pozitivní procentuální shoda je $32 + 32/86 = 74,4\%$ (95 % interval spolehlivosti = 63,8 % – 83,2 %).
- Negativní procentuální shoda je $53/58 = 91,4\%$ (95 % interval spolehlivosti = 80,9 % – 97,1 %)

Celková shoda je $32 + 32 + 53/144 = 81,2\%$ (95 % interval spolehlivosti = 73,9 % – 87,2 %).

Tabulka 9. Skupina 1: Konsenzuální imunohistochemická (IHC) skóre protilátky klon 4B5 od tří patologů v porovnání s metodou FISH

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

Skupina 1: Funkční charakteristiky pro protilátku klon 4B5 a metodu FISH, prezentace 2 x 2 (kde jsou skóre 2 a 3 pokládána za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $55 + 25/86 = 93,0\%$ (95 % interval spolehlivosti = 87,9 % – 96,3 %).
- Negativní procentuální shoda je $47/58 = 81,0\%$ (95 % interval spolehlivosti = 73,4 % – 86,0 %)

Celková shoda je $55 + 25 + 47/144 = 88,2\%$ (95 % interval spolehlivosti = 82,1 % – 92,2 %).

Tabulka 10. Skupina 2: Konsenzuální IHC hodnocení PATHWAY HER-2/neu (CB11) tří patologů oproti FISH.

Skóre protilátky PATHWAY HER-2/neu (CB11)	Výsledek metody FISH		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Celkem	93	85	178

Skupina 2: Charakteristiky účinnosti pro PATHWAY HER-2/neu (CB11) a FISH, prezentace 2 x 2 (kde hodnocení 2 a 3 jsou považována za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $72 + 13/93 = 91,3\%$ (95 % interval spolehlivosti = 85,0 % – 96,7 %).
- Negativní procentuální shoda je $77/85 = 90,6\%$ (95 % interval spolehlivosti = 83,9 % – 96,3 %)

Celková shoda je $72 + 13 + 77/178 = 91,0\%$ (95 % interval spolehlivosti = 86,5 % – 94,9 %).

Tabulka 11. Skupina 2: Konsenzuální imunohistochemická (IHC) skóre protilátky klon 4B5 od tří patologů v porovnání s metodou FISH

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

Skupina 2: Funkční charakteristiky pro protilátku klon 4B5 a metodu FISH, prezentace 2 x 2 (kde jsou skóre 2 a 3 pokládána za pozitivní).

- Pozitivní procentuální shoda je $72 + 11/93 = 89,2\%$ (95 % interval spolehlivosti = 82,5 % – 95,1 %).
- Negativní procentuální shoda je $77/85 = 90,6\%$ (95 % interval spolehlivosti = 84,0 % – 96,4 %)

Celková shoda je $72 + 11 + 77/178 = 90,0\%$ (95 % interval spolehlivosti = 85,4 % – 93,6 %).

Reprodukovatelnost vzorků ze srovnávacích studií mezi jednotlivými patologiemi

Jelikož je známo, že různé patologové mohou interpretovat imunohistochemické preparáty různě, byli k hodnocení preparátů přizváni v každé z těchto dvou skupin tři patologové (celkem tedy 6 patologů). K vyslovení konečného výsledku bylo použito pravidlo dva ze tří. Níže je uveden souhrn výsledků získaných z hodnocení tří patologů ve srovnávacích studiích vzorků pro každou skupinu.

Tabulka 12. Skupina 1: Skóre protilátky klon 4B5 od tří patologů

Skóre HER2	Skóre protilátky klon 4B5		
	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Celkem	174	178	178
Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se o více než jednu úroveň (tj. 0, 2+) lišilo celkem 3 vzorky. Vzorek 1: Jeden patolog hodnotil jako 2+, dva patologové jako 0+. Vzorek 2: Jeden patolog přidělil skóre 0+, dva patologové skóre 2+. Vzorek 3: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 1+ a třetí skóre 2+.			

Tabulka 13. Skupina 1: Hodnocení PATHWAY HER-2/neu (CB11) třemi patologi.

Skóre HER2	Skóre protilátky PATHWAY HER-2/neu (CB11)		
	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Celkem	174	178	178
Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se o více než jednu úroveň (tj. 1–3+) lišil celkem 1 vzorek. Vzorek 1: Jeden patolog přidělil skóre 1+, druhý skóre 2+ a třetí skóre 3+.			

Tabulka 14. Skupina 2: Skóre protilátky klon 4B5 od tří patologů.

Skóre HER2	Skóre protilátky klon 4B5		
	Hodnotitel 4	Hodnotitel 5	Hodnotitel 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Celkem	141	144	144
Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se o více než jeden stupeň (např. 0, 3+) lišilo 6 vzorků. Vzorek 1: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 0+ a třetí skóre 2+. Vzorek 2: Jeden patolog přidělil skóre 1+, druhý skóre 1+ a třetí skóre 3+. Vzorek 3: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 2+ a třetí patolog skóre 2+. Vzorky 4 a 5: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 2+ a třetí skóre 2+. Vzorek 6: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 3+ a třetí skóre 3+.			

Tabulka 15. Skupina 2: Hodnocení PATHWAY HER-2/neu (CB11) třemi patologi.

Skóre HER2	Skóre protilátky PATHWAY HER-2/neu (CB11)		
	Hodnotitel 4	Hodnotitel 5	Hodnotitel 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Celkem	144	144	144
Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se o více než jednu úroveň (tj. 0–2+) lišilo celkem 8 vzorků. Vzorky 1–6: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 1+ a třetí skóre 2+. Vzorky 7 a 8: Jeden patolog přidělil skóre 0+, druhý skóre 2+ a třetí skóre 2+.			

Následuje srovnání rozsahů procentuální shody napříč páry patologů (tři páry pro každou skupinu).

Tabulka 16. Rozsahy shody 2X2* u třech patologů

	Celková procentuální shoda	Pozitivní procentuální shoda	Negativní procentuální shoda
Protílátka klon 4B5 vs. PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
Skupina 1	82,6 – 86,9 %	97,3 – 100,0 %	68,0 – 75,4 %
Skupina 2	88,2 – 95,5 %	87,6 – 95,6 %	86,1 – 95,4 %
Klon 4B5 vs. metoda FISH			
Skupina 1	86,8 – 88,2 %	90,7 – 94,2 %	79,3 – 81,0 %
Skupina 2	87,4 – 89,9 %	88,2 – 90,0 %	84,5 – 91,8 %
PATHWAY HER-2/neu (CB11) vs. FISH			
Skupina 1	79,9 – 84,0 %	73,3 – 80,2 %	89,7 – 89,7 %
Skupina 2	84,8 – 93,3 %	86,7 – 92,5 %	82,7 – 94,1 %

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

Závěr: Z údajů získaných z těchto studií vyplývá, že primární protílátka klon 4B5 byla ve své schopnosti lokalizovat příslušné membránové barvení u normálních a neoplastických tkání specifická a reprodukovatelná. Údaje z porovnání metod prokázaly, že primární protílátka klon 4B5 je indikována jako pomůcka při hodnocení pacientů s karcinomem prsu, u nichž je zvažována terapie přípravkem Herceptin.

- Funkční charakteristiky na přístroji BenchMark ULTRA za použití detekčních souprav VIEW DAB Detection Kit nebo ultraView Universal DAB Detection Kit:**
 Reprodukovatelnost barvení na přístroji BenchMark ULTRA mezi laboratořemi a mezi dny: Na studii mezilaboratorní reprodukovatelnosti se podílely tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech. Na jednotlivá pracoviště studie byly k barvení na barvicích automatech VENTANA BenchMark ULTRA podle doporučeného barvicího protokolu a za použití soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit distribuovány preparáty s formaldehydem fixovanými a v parafinu zalitými řezy získanými od 48 případů invazivního karcinomu prsu [po 12 z každé kategorie HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] a 1 pár kontrolních preparátů PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides. Kontroly zahrnovaly kontrolní preparáty PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhý preparát barvený negativní Ig reagenty. Patologové, pro které byl status případů zaslepený, preparáty vyhodnotili a přiřadili jim klinické skóre (0, 1+, 2+, 3+). Výsledky analyzovala společnost Ventana. Za použití standardní nomenklatury pro tabulky 2x2 byla vypočtena průměrná pozitivní shoda (APA) mezi pracovišti jako $[2a/(2a+b+c)]$ a průměrná negativní shoda (ANA) jako $[2d/(2d+b+c)]$. Průměrná pozitivní shoda na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) mezi všemi pracovišti činila 90,0 % (108/120) a průměrná negativní shoda mezi všemi pracovišti dosáhla 92,9 % (156/168). V případě porovnání pracovišť v párech byla průměrná pozitivní shoda vypočtena jako $a/(a+c)$ a průměrná negativní shoda jako $d/(b+d)$. Hodnota průměrné

pozitivní shody činila 93,0 % (40/43) mezi pracovišti A vs. B, 87,2 % (34/39) mezi pracovišti A vs. C a 89,5 % (34/38) mezi pracovišti B vs. C. Hodnota průměrně negativní shody činila 94,3 % (50/53) mezi pracovišti A vs. B, 91,2 % (52/57) mezi pracovišti A vs. C a 93,1 % (54/58) mezi pracovišti B vs. C.

Následující tabulky uvádějí ve formátu 3 x 3 výsledky každého odečítatele na základě klinického skóre, přičemž skóre 2+ a 3+ jsou oddělena.

Tabulka 17. Analýza hodnot mezilaboratorní shody mezi pracovišti A vs. B ve formátu 3 x 3 – protilátka klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou *ultraView Universal DAB Detection Kit*.

Pracoviště A	Pracoviště B			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Celkem	12	9	27	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)				43/48 (89,6)

Tabulka 18. Analýza mezilaboratorní shody mezi pracovišti A vs. C ve formátu 3 x 3 – protilátka klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit

	Pracoviště C			
Pracoviště A	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Celkem	12	5	31	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)				42/48 (87,5)

Tabulka 19. Analýza mezilaboratorní shody mezi pracovišti B vs. C ve formátu 3 x 3 – protilátka klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit

	Pracoviště C			
Pracoviště B	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Celkem	12	5	31	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%)				44/48 (91,7)

10. BenchMark ULTRA Reprodukovatelnost barvení na přístroji mezi jednotlivými dny:

Část studie hodnotící reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny zahrnovala 12 případů se záměrným rozdělením na přibližně tři (3) případy z každého klinického skóre (0, 1+, 2+, 3+). V jedné instituci (pracoviště C) provádějící část studie hodnotící reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny proběhlo na přístroji BenchMark ULTRA celkem pět cyklů v časovém intervalu nejméně 20 dní tak, že žádné dva dny, kdy se provádělo barvení, nenásledovaly po sobě. Hodnoty průměrné pozitivní shody i průměrné negativní shody pro část studie hodnotící reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny založené na klinickém hodnocení barvení protilátkou klon 4B5 na pracovišti C mezi všemi dny činily 100 %. Hodnoty celkové procentuální shod (OPA) pro porovnání mezi jednotlivými

dny na základě klinických skóre činily 100 % pro každé vzájemné porovnání dnů i pro všechny kombinace dnů.

11. Studie porovnávající barvicí platformu BenchMark ULTRA s barvicími platformami BenchMark XT:

Do srovnávací studie platformou byly zapojeny dvě laboratoře provádějící barvení a dvě pracoviště provádějící odečítání, všechny v USA. Na dvě pracoviště provádějící barvení byly k barvení na přístrojích BenchMark XT a BenchMark ULTRA podle příslušných doporučených barvicích protokolů za použití detekční soupravy *ultraView Universal DAB Detection Kit* náhodně distribuovány preparáty s formaldehydem fixovanými a v parafínu zalitými řezy získanými od 280 případů invazivního karcinomu prsu [přibližně 70 případů z každé kategorie HER2 (0-1+, 2+, 3+), 140 případů na každé pracoviště]. Kontroly zahrnovaly kontrolní preparáty *PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides* a druhy preparát barvený negativní Ig reagensii. Obarvené případy z pracoviště 1 a pracoviště 2 byly rozděleny do čtyř sad preparátů a tyto sady byly po jedné předány třem různým kvalifikovaným odečitatelům (patologům), jednomu odečitateli na pracovišti 1, jednomu na pracovišti 2 a jednomu na pracovišti 3. Patologové, kteří neznali status případů ani platformu barvení, vyhodnotili všechny čtyři sady preparátů a každému případu přiřadili klinické skóre (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky analyzovala společnost Ventana. Hodnoty pozitivní procentuální shody (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) činily 91,6 % (85,9) u odečitatele A, 91,2 % (85,3) u odečitatele B a 94,9 % (89,3) u odečitatele C. Hodnoty negativní procentuální shody (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) činily 91,9 % (85,8) u odečitatele A, 93,8 % (88,3) u odečitatele B a 99,3 % (96,3) u odečitatele C. Celková procentuální shoda mezi barvením protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě analýzy klinického hodnocení (pozitivního, negativního) ve formátu 2 x 2 činila 91,8 % u odečitatele A, 92,5 % u odečitatele B a 97,4 % u odečitatele C. V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty shody mezi platformami ve formátu 3 x 3 pro každého odečitatele na základě klinického skóre (0/1+, 2+, 3+):

Tabulka 20. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark ULTRA versus BenchMark XT ve formátu 3 x 3 – odečítatel A.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Odečítatel A	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Celkem	96	47	124	267
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)			226/267 (84,6) (79,8-88,5)	

Tabulka 21. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark ULTRA versus BenchMark XT ve formátu 3 x 3 – odečítatel B.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Odečítatel B	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Celkem	69	68	130	267
Celková procentuální shoda: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)			242/267 (90,6) (86,5-93,6)	

Tabulka 22. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark ULTRA versus BenchMark XT ve formátu 3 x 3 – odečítatel C.

Přístroj BenchMark ULTRA	Přístroj BenchMark XT			
Odečítatel C	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Celkem	66	52	149	267
Celková procentuální shoda: 257/267 (96,3) (93,2-98,0) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)				

12. **Reprodukovatelnost mezi patologi u vzorků ze srovnávací studie platform:**

Pro každou platformu byly pro šest možných párových kombinací mezi odečítateli vypočteny hodnoty pozitivní a negativní shody s oboustrannými 95 % intervaly spolehlivosti.

Pro přístroj BenchMark ULTRA činily hodnoty pozitivní procentuální shody 94,7 % (126/133) pro odečítatele A vs. B, 98,2 % (111/113) pro odečítatele A vs. C, 98,2 % (111/113) pro odečítatele B vs. C, 89,4 % (126/141) pro odečítatele B vs. A, 78,7 % (111/141) pro odečítatele C vs. A a 83,5 % (111/133) pro odečítatele C vs. B. Hodnoty negativní procentuální shody činily 88,8 % (119/134) pro odečítatele A vs. B, 80,5 % (124/154) pro odečítatele A vs. C, 85,7 % (132/154) pro odečítatele B vs. C, 94,4 % (119/126) pro odečítatele B vs. A, 98,4 % (124/126) pro odečítatele C vs. A a 98,5 % (132/134) pro odečítatele C vs. B. Hodnota celkové procentuální shody byla nejvyšší mezi odečítateli A a B (91,8 %) a nižší mezi odečítateli B a C (91,0 %) a odečítateli A a C (88,8 %).

Pro přístroj BenchMark XT činily hodnoty pozitivní procentuální shody 94,9 % (130/137) pro odečítatele A vs. B, 98,3 % (116/118) pro odečítatele A vs. C, 98,3 % (116/118) pro odečítatele B vs. C, 90,9 % (130/143) pro odečítatele B vs. A, 81,1 % (116/143) pro odečítatele C vs. A a 84,7 % (116/137) pro odečítatele C vs. B. Hodnoty negativní procentuální shody činily 90,0 % (117/130) pro odečítatele A vs. B, 81,9 % (122/149) pro odečítatele A vs. C, 85,9 % (128/149) pro odečítatele B vs. C, 94,4 % (117/124) pro odečítatele B vs. A, 98,4 % (122/124) pro odečítatele C vs. A a 98,5 % (128/130) pro odečítatele C vs. B. Hodnota celkové procentuální shody byla nejvyšší mezi odečítateli A a B (92,5 %) a nižší mezi odečítateli B a C (91,4 %) a odečítateli A a C (89,1 %).

13. **Studie porovnávající detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit:**

Skupina pracoviště 1 zahrnující 140 formalínem fixovaných a v parafínu zalitých případů invazivního karcinomu prsu [přibližně 35 případů z každé kategorie HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] byla použita ve srovnávací studii detekčních souprav iVIEW DAB Detection Kit versus ultraView Universal DAB Detection Kit při barvení protilátkou klon 4B5 na barvicím automatu BenchMark ULTRA. Srovnávací studie detekčních souprav se účastnila jediná laboratoř provádějící barvení a tři pracoviště provádějící odečítání v USA. Pro barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA byly zjišťovány hodnoty pozitivní procentuální shody mezi výsledky získanými za použití detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit a detekční soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) a tyto hodnoty činily 95,8 % (68/71) u odečítatele A, 96,9 % (63/65) u odečítatele B a 96,5 % (55/57) u odečítatele C. Hodnoty negativní procentuální shody mezi detekčními metodami činily 90,8 % (59/65) u odečítatele A, 91,5 % (65/71) u odečítatele B a 97,5 % (77/79) u odečítatele C. Hodnoty celkové procentuální shody mezi detekčními soupravami činily 93,4 % (127/136) u odečítatele A, 94,1 % (128/136) u odečítatele B a 97,1 % (132/136) u odečítatele C. V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty shody při porovnání detekce ve formátu 3 x 3 pro každého odečítatele na základě klinického skóre (0/1+, 2+, 3+):

Tabulka 23. Odečítatel A, analýza hodnot shody při porovnání detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit ve formátu 3 x 3 – barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Odečítatel A	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Celkem	46	25	65	136
Celková procentuální shoda: 119/136 (87,5) (80,9-92,0) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)				

Tabulka 24. Odečítatel B, analýza hodnot shody při porovnání detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit ve formátu 3 x 3 – barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Odečítatel B	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Celkem	33	32	71	136
Celková procentuální shoda: 128/136 (94,1) (88,8-97,0) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)				

Tabulka 25. Odečítatel C, analýza hodnot shody při porovnání detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit ve formátu 3 x 3 – barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Odečítatel C	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Celkem	32	25	79	136
Celková procentuální shoda: 132/136 (97,1) (92,7-98,9) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)				

14. **Reprodukovatelnost mezi patologi u vzorků ze srovnávací studie detekčních souprav:**

Pro každou metodu byly pro šest možných párových kombinací mezi odečítateli vypočteny hodnoty pozitivní a negativní shody s oboustrannými 95 % intervaly spolehlivosti.

Pro detekční soupravu iVIEW DAB Detection Kit činily hodnoty pozitivní procentuální shody 100,0 % (69/69) pro odečítatele A vs. B, 98,2 % (56/57) pro odečítatele A vs. C, 96,5 % (55/57) pro odečítatele B vs. C, 93,2 % (69/74) pro odečítatele B vs. A, 75,7 % (56/74) pro odečítatele C vs. A a 79,7 % (55/69) pro odečítatele C vs. B. Hodnoty negativní procentuální shody činily 92,5 % (62/67) pro odečítatele A vs. B, 77,2 % (61/79) pro odečítatele A vs. C, 82,3 % (65/79) pro odečítatele B vs. C, 100,0 % (62/62) pro odečítatele B vs. A, 98,4 % (61/62) pro odečítatele C vs. A a 97,0 % (65/67) pro odečítatele C vs. B. Hodnota celkové

shody byla nejvyšší mezi odečitateli A a B (96,3 %) a nižší mezi odečitateli A a C (86,0 %) a odečitateli B a C (88,2 %).

Pro detekční soupravu *ultraView* Universal DAB Detection Kit činily hodnoty pozitivní procentuální shody 96,9 % (63/65) pro odečitatele A vs. B, 98,2 % (56/57) pro odečitatele A vs. C, 98,2 % (56/57) pro odečitatele B vs. C, 88,7 % (63/71) pro odečitatele B vs. A, 78,9 % (56/71) pro odečitatele C vs. A a 86,2 % (56/65) pro odečitatele C vs. B. Hodnoty negativní procentuální shody činily 88,7 % (63/71) pro odečitatele A vs. B, 81,0 % (64/79) pro odečitatele A vs. C, 88,6 % (70/79) pro odečitatele B vs. C, 96,9 % (63/65) pro odečitatele B vs. A, 98,5 % (64/65) pro odečitatele C vs. A a 98,6 % (70/71) pro odečitatele C vs. B. Hodnoty celkové shody byly u všech párů odečitatelů podobné, činily 92,6 % (126/136) mezi odečitateli A a B, 88,2 % (120/136) mezi odečitateli A a C a 92,6 % (126/136) mezi odečitateli B a C.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY U ŽALUDEČNÍCH PŘÍPADŮ

1. Reprodukovatelnost mezi cykly na přístroji BenchMark XT byla stanovena v pěti cyklech provedených během 5 dnů (následujících po sobě). Pět sklíček obsahujících tři případy žaludeční tkáně, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+ a 3+, prokázalo 100 % shodu pozitivní/negativní hodnoty pro každou tkáň.
2. Reprodukovatelnost v rámci cyklu na přístroji BenchMark XT byla stanovena na 28 sklíčkách obsahujících tři případy žaludeční tkáně, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+ a 3+. Všechny případy měly pro každý typ tkáně stejné pozitivní/negativní skóre.

Reprodukovatelnost v rámci platformy byla stanovena na třech přístrojích BenchMark XT. Všechny 30 sklíček z každého ze dvou různých vícetkáňových bloků obsahujících tři případy žaludeční tkáně, jejichž skóre exprese HER2 činilo 0, 1+, 2+ a 3+, vykazovalo v těchto cyklech pro každý typ tkáně stejné pozitivní/negativní hodnocení.

Reprodukovatelnost v rámci platformy byla testována na třech přístrojích BenchMark ULTRA. V těchto cyklech všech 15 sklíček z jednoho vícetkáňového bloku vykazovalo pro každý typ tkáně stejné pozitivní/negativní hodnocení.

Reprodukovatelnost mezi platformami byla testována na třech přístrojích BenchMark XT a třech přístrojích BenchMark ULTRA. V těchto cyklech všech 30 sklíček z jednoho vícetkáňového bloku vykazovalo pro každý typ tkáně stejné pozitivní/negativní hodnocení.

3. **Porovnání detekčních souprav *VIEW* DAB Detection Kit a *ultraView* Universal DAB Detection Kit u žaludečních případů:**

K porovnání detekčních souprav na dvou přístrojích (přístroji BenchMark XT a přístroji BenchMark ULTRA) za použití detekčních souprav *VIEW* DAB Detection Kit a *ultraView* Universal DAB Detection Kit byla použita protilátka klon 4B5. V rámci testování bylo použito 210 případů tkáně. Obarvená sklíčka byla hodnocena podle pozitivního/negativního skóre.

Jak u detekčních souprav, tak u přístrojů byly hodnoty pro morfologii i pozadí 100 % přijatelné. Následující tabulky uvádějí přímé porovnání pozitivního a negativního klinického hodnocení mezi detekčními soupravami pro každý přístroj.

Tabulka 26. Klinické hodnocení pro detekční soupravu *ultraView* Universal DAB Detection Kit versus *VIEW* DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	21	0	21
Negativní	0	189	189
Celkem	21	189	210
	n/N	%	
Pozitivní procentuální shoda	21/21	100	
Negativní procentuální shoda	189/189	100	
Celková procentuální shoda	210/210	100	

Tabulka 27. Porovnání klinického hodnocení na barvicích platformách BenchMark XT a BenchMark ULTRA za použití detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT barvicí platforma s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA barvicí platforma s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	20	1	21
Negativní	0	189	189
Celkem	20	190	210
	n/N	% (95 % interval spolehlivosti)	
Pozitivní procentuální shoda	20/20	100 (83,9-100)	
Negativní procentuální shoda	189/190	99,5 (97,1-99,9)	
Celková procentuální shoda	209/210	99,5 (97,4-99,9)	

4. **Porovnání protilátky klon 4B5 s testem HercepTest u lidského karcinomu žaludku:**

Byla provedena zaslepená externí studie s cílem porovnání účinnosti barvení protilátkou klon 4B5 na přístroji BenchMark XT s účinností barvení pomocí testu Dako HercepTest. Ve studii bylo testováno přibližně 239 případů karcinomu žaludku spolu se 159 případy z laboratoře TARGOS, z klinické studie ToGA, která zkoumala status HER2 a klinické výsledky u pacientů léčených přípravkem Herceptin. Laboratoř barvila případy protilátkou klon 4B5 a za použití testu HercepTest. Patolog přiřadil případům skóre na stupnici 0/1+, 2+ a 3+. Pozitivní případy měly skóre 2+ a 3+, negativní případy měly skóre 0 a 1+.

Tabulky 28 a 29 obsahují hodnoty shody mezi protilátkou klon 4B5 a testem HercepTest v členění podle zdroje tkáně. Tabulka 28 porovnává pozitivní versus negativní výsledky, zatímco tabulka 29 využívá imunohistochemickou stupnici pro 3 kategorie, 0/1+, 2+ a 3+. Celková shoda u všech tkání činí 91,0 % v tabulce 28 a 95,3 % v tabulce 29.

Tabulka 28. Hodnoty procentuální shody a 95 % intervaly spolehlivosti pro protilátku klon 4B5 (IHC) a test HercepTest v členění podle zdroje tkáně. Oba imunohistochemické testy byly hodnoceny jako pozitivní versus negativní (0/1+ versus 2+/3+).

n	Celková procentuální shoda (95 % interval spolehlivosti)	n	Pozitivní procentuální shoda (95 % interval spolehlivosti)	n	Negativní procentuální shoda (95 % interval spolehlivosti)
362/398	91,0 (87,7-93,4)	46/56	82,1 (70,2-90,0)	316/342	92,4 (89,1-94,8)

Tabulka 29. Hodnoty procentuální shody a 95 % intervaly spolehlivosti pro protilátku klon 4B5 (IHC) a test HercepTest v členění podle zdroje tkáně. Imunohistochemickým testům bylo přiřazeno skóre 0/1+, 2+ nebo 3+.

Zdroj tkáně	n	Celková procentuální shoda (95 % interval spolehlivosti)
TMA a ToGA	355/398	89,2 (85,8-91,9)

5. Mezilaboratorní reprodukovatelnost pro protilátku klon 4B5: Studie byla prováděna na třech výzkumných pracovištích. Vzorky byly do studie vybrány na základě imunohistochemického klinického skóre podle protilátky klon 4B5 v takovém složení, aby byl počet pozitivních (3+) a negativních (0, 1+) případů přibližně stejný. Navíc byly zkoumány další až čtyři případy karcinomu žaludku zařazené jako 2+.

Všechna tři pracoviště používala platformu BenchMark XT i platformu BenchMark ULTRA a na každé platformě uskutečnila čtyři barvicí cykly. Případy byly pro barvení náhodně rozděleny za použití stratifikovaného randomizačního postupu, který přiřadil případy tak, aby každý cyklus obsahoval případy zastupující všechny kategorie skóre HER2 u karcinomu žaludku. Cykly na každém přístroji na každém pracovišti obsahovaly stejné případy. Na každém pracovišti bylo od každého případu barveno jedno skličko protilátkou klon 4B5 a jiné skličko od téhož případu kontrolním imunoglobulinem CONFIRM Negative Control Rabbit Ig na platformě BenchMark ULTRA. Podobně byl na každém pracovišti barven druhý pár skliček od téhož případu na platformě BenchMark XT. Sklička hodnotil na každém pracovišti jeden kvalifikovaný odečítatel, který neznal předem stanovená imunohistochemická (IHC) klinická skóre žádného ze vzorků.

Celková shoda mezi všemi hodnotitelnými případy činila 100 % pro všechna tři vzájemná porovnání mezi pracovišti jak pro platformu BenchMark ULTRA, tak pro platformu BenchMark XT. Celková shoda mezi platformou BenchMark ULTRA a platformou BenchMark XT činila pro všechny hodnotitelné případy v každém ze tří pracovišť 100 %. Hodnoty přijatelnosti morfologie i pozadí dosáhly u všech případů a u obou platform na pracovištích A a C 100 % a na pracovišti B > 95 %, viz následující tabulky.

Tabulka 30. Celková shoda klinického hodnocení mezi pracovišti: všechny hodnotitelné případy

Přístroj BenchMark ULTRA	Celková procentuální shoda
Pracoviště A vs. pracoviště B: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	30/30 (100 %) (88,6 – 100)
Pracoviště A vs. pracoviště C: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	30/30 (100 %) (88,6 – 100)
Pracoviště B vs. pracoviště C: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	30/30 (100 %) (88,6 – 100)
Přístroj BenchMark XT	Celková procentuální shoda
Pracoviště A vs. pracoviště B: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	31/31 (100 %) (89,0 – 100,0)
Pracoviště A vs. pracoviště C: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	31/31 (100 %) (89,0 – 100,0)
Pracoviště B vs. pracoviště C: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	31/31 (100 %) (89,0 – 100,0)

Tabulka 31. Celková shoda klinického hodnocení mezi platformami: všechny hodnotitelné případy

Přístroj BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT	Celková procentuální shoda
Pracoviště A: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	40/40 (100 %) (91,2 – 100)
Pracoviště B: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	34/34 (100 %) (89,8 – 100)
Pracoviště C: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	32/32 (100 %) (89,3 – 100)

Tabulka 32. Hodnoty přijatelnosti barvení pozadí a morfologie: všechny případy

Přístroj BenchMark ULTRA	Pracoviště A	Pracoviště B	Pracoviště C
Hodnoty přijatelnosti morfologie	44/44 (100 %)	43/44 (97,7 %)	44/44 (100 %)
Hodnoty přijatelnosti pozadí	44/44 (100 %)	42/44 (95,5 %)	44/44 (100 %)
Přístroj BenchMark XT	Pracoviště A	Pracoviště B	Pracoviště C
Hodnoty přijatelnosti morfologie	44/44 (100 %)	43/44 (97,7 %)	44/44 (100 %)
Hodnoty přijatelnosti pozadí	44/44 (100 %)	43/44 (97,7 %)	44/44 (100 %)

6. Studie porovnávající barvicí platformy BenchMark a BenchMark GX s barvicí platformou BenchMark XT:

Sklička s řezy ze 3 TMA obsahující formalínem fixované a v parafínu zalité případy karcinomu žaludku [přibližně 50 případů na TMA] byla obarvena na přístroji BenchMark XT, přístroji BenchMark a přístroji BenchMark GX podle příslušných doporučených barvicích protokolů pro detekční soupravu *ultraView* Universal DAB Detection Kit a *VIEW* DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly kontrolní sklička PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé skličko vždy s případem barveným negativní Ig reagentií. Obarvená sklička vyhodnotil jeden odečítatel (patolog).

Hodnoty celkové shody (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) byly pro barvení protilátkou klon 4B5 na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) následující: přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,0 % (94,2 – 99,3), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97,4 % (93,6 – 99,0), přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 96,6 % (92,7 – 98,4), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 95,9 % (91,8 – 98,0).

Hodnoty pozitivní shody (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení protilátkou klon 4B5 byly na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) následující: přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91,7 % (64,4 – 98,5), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78,6 % (52,4 – 92,4), přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 80,0 % (54,8 – 93,0), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 73,3 % (48,0 – 89,1).

Hodnoty negativní shody (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení protilátkou klon 4B5 byly na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního) následující: přístroj BenchMark versus BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,5 % (94,8–99,6), přístroj BenchMark GX versus BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99,3 % (96,1–99,9), přístroj BenchMark versus BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 98,1 % (94,6–99,4), přístroj BenchMark GX versus BenchMark XT s detekční soupravou *VIEW* DAB Detection Kit 98,1 % (94,5–99,3). V následujících tabulkách jsou uvedeny prezentace hodnot shody pro všechna porovnání ve formátu 2 x 2 na základě klinického hodnocení (pozitivního, negativního).

Tabulka 33. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark versus BenchMark XT za použití detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit ve formátu 2 x 2

Protílátka klon 4B5 s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Přístroj BenchMark	Přístroj BenchMark XT		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	11	2	13
Negativní	1	133	134
Celkem	12	135	147
	n/N	% (95 % interval spolehlivosti)	
Celková procentuální shoda	144/147	98,0 % (94,2-99,3)	
Pozitivní procentuální shoda	11/12	91,7 % (64,6-98,5)	
Negativní procentuální shoda	133/135	98,5 % (94,8-99,6)	

Tabulka 34. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark GX versus BenchMark XT za použití detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit ve formátu 2 x 2

Protílátka klon 4B5 s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Přístroj BenchMark GX	Přístroj BenchMark XT		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	11	1	12
Negativní	3	140	143
Celkem	14	141	155
	n/N	% (95 % interval spolehlivosti)	
Celková procentuální shoda	151/155	97,4 % (93,6-99,0)	
Pozitivní procentuální shoda	11/14	78,6 % (52,4-92,4)	
Negativní procentuální shoda	140/141	99,3 % (96,1-99,9)	

Tabulka 35. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark versus BenchMark XT za použití detekční soupravy *VIEW* DAB Detection Kit ve formátu 2 x 2

Protílátka klon 4B5 s detekční soupravou <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
Přístroj BenchMark	Přístroj BenchMark XT		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	12	3	15
Negativní	3	156	159
Celkem	15	159	174
	n/N	% (95 % interval spolehlivosti)	
Celková procentuální shoda	168/174	96,6 % (92,7-98,4)	
Pozitivní procentuální shoda	12/15	80,0 % (54,8-93,0)	
Negativní procentuální shoda	156/159	98,1 % (94,6-99,4)	

Tabulka 36. Analýza hodnot shody mezi platformami pro přístroj BenchMark GX versus BenchMark XT za použití detekční soupravy *VIEW* DAB Detection Kit ve formátu 2 x 2

Protílátka klon 4B5 s detekční soupravou <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
Přístroj BenchMark GX	Přístroj BenchMark XT		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	11	3	14
Negativní	4	154	158
Celkem	15	157	172
	n/N	% (95 % interval spolehlivosti)	
Celková procentuální shoda	165/172	95,9 % (91,8-98,0)	
Pozitivní procentuální shoda	11/15	73,3 % (48,0-89,1)	
Negativní procentuální shoda	154/157	98,1 % (94,5-99,3)	

Závěr: Z údajů získaných z těchto studií vyplývá, že protílátka VENTANA HER2 (4B5) byla ve své schopnosti příslušného barvení neoplastických tkání prsu a žaludku specifická i reprodukovatelná. Údaje z porovnání metod a hodnocení mezilaboratorní reprodukovatelnosti prokázaly, že protílátka VENTANA HER2 (4B5) je indikována jako pomůcka při hodnocení pacientů s karcinomem prsu a žaludku, u nichž je zvažována terapie přípravkem Herceptin.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY – PERJETA A KADCYLA

Studie porovnávající metodu HER2 Breast se vstupním testem pro účast ve studiích přípravků Perjeta a Kadcyla u rakoviny prsu

Rovnocennost se vstupními testy pro účast ve studiích přípravků Perjeta a Kadcyla byla stanovena barvením zkušebních vzorků za použití testu VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Protílkou VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) bylo obarveno 2753 vzorků hodnocených pro studii Perjeta a 99 vzorků hodnocených pro studii Kadcyla. Byla stanovena pozitivní (PPA), negativní (NPA) a celková (OPA) procentuální shoda. Metodou přiřazení skóre byl stanoven 95 % oboustranný interval spolehlivosti (CI).

Tabulka 37. Shoda mezi stanoveními protilátky klon 4B5 a Dako v hodnocení stavu HER2 u všech subjektů hodnotitelných na HER2. U subjektů hodnotitelných postupem IHC byl status HER2 jako pozitivní nebo negativní stanoven jak testem protilátky klon 4B5, tak vstupním IHC testem.

Studie	Skóre protilátky klon 4B5 [b]	Status podle testu DAKO HER2 [a] [b]		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Perjeta a Kadcyla	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Celkem	2558	272	2830
Pozitivní procentuální shoda (PPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)		2380/2558 (93,0) (92,0-94,0)		
Negativní procentuální shoda (NPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)		257/272 (94,5) (91,1-96,6)		
Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)		2637/2830 (93,2) (92,2-94,1)		

[a] Pozitivní = IHC pozitivní a/nebo ISH amplifikované. Negativní = IHC negativní a ne ISH amplifikované nebo ISH neamplifikované a ne IHC pozitivní.

[b] IHC: pozitivní = 3+; negativní = 0, 1+ nebo 2+.

Tabulka 38. Shoda mezi testy protilátky klon 4B5 a Dako u IHC Statusu u všech IHC hodnotitelných subjektů hodnocení. U subjektů hodnotitelných postupem IHC byl status HER2 jako pozitivní nebo negativní stanoven jak testem protilátky klon 4B5, tak vstupním IHC testem.

Studie	Status podle testu protilátky klon 4B5 [a]	Status podle testu Dako HercepTest [a]		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Perjeta a Kadcyla	Pozitivní	2330	65	2395
	Negativní	21	414	435
	Celkem	2351	479	2830
	Pozitivní procentuální shoda (PPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2330/2351 (99,1) (98,6-99,4)		
	Negativní procentuální shoda (NPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	414/479 (86,4) (83,1-89,2)		
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2744/2830 (97,0) (96,3-97,5)		
Perjeta	Pozitivní	2267	63	2330
	Negativní	10	399	409
	Celkem	2277	462	2739
	Pozitivní procentuální shoda (PPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2267/2277 (99,6) (99,2-99,8)		
	Negativní procentuální shoda (NPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	399/462 (86,4) (82,9-89,2)		
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2666/2739 (97,3) (96,7-97,9)		
Kadcyla	Pozitivní	63	2	65
	Negativní	11	15	26
	Celkem	74	17	91
	Pozitivní procentuální shoda (PPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	63/74 (85,1) (75,3-91,5)		
	Negativní procentuální shoda (NPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	15/17 (88,2) (65,7-96,7)		
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	78/91 (85,7) (77,1-91,5)		

[a] pozitivní = 3+; negativní = 0, 1+ nebo 2+.

Tabulka 39. Shoda mezi testy protilátky klon 4B5 a Dako pro IHC skóre u všech subjektů hodnotitelných IHC postupem. U subjektů hodnotitelných postupem IHC byl status HER2 jako pozitivní nebo negativní stanoven jak testem protilátky klon 4B5, tak vstupním IHC testem.

Studie	Skóre protilátky klon 4B5	Skóre v testu Dako HercepTest			Celkem
		3+	2+	0/1+	
Perjeta a Kadcyly	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Celkem	2351	325	154	2830
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti) 2703/2830 (95,5) (94,7-96,2)				
Perjeta	3+	2267	62	1	2330
	2+	9	226	13	248
	0/1+	1	24	136	161
	Celkem	2277	312	150	2739
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti) 2629/2739 (96,0) (95,2-96,7)				
Kadcyla	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Celkem	74	13	4	91
	Celková procentuální shoda (OPA) n/N (%) (95 % interval spolehlivosti) 74/91 (81,3) (72,1-88,0)				

Tabulka 40. Přijatelnost barvení protilátkou klon 4B5. Subjekty hodnocení testované postupem IHC. Barvení IHC se považuje za přijatelné, jestliže bylo možno stanovit platné IHC skóre (0, 1+, 2+ nebo 3+). K důvodům nepřijatelnosti barvení patří nepřijatelná negativní kontrola, ztráta tkáně, nedostatečný nádor, nepřijatelné pozadí a nepřijatelná morfologie.

Parametr	Perjeta	Kadcyla	Perjeta a Kadcyla
Počet počátečních IHC testů	2753	99	2852
Počáteční přijatelnost barvení: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2708/2753 (98,4) (97,8, 98,8)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2800/2852 (98,2) (97,6, 98,6)
Počet opakovacích IHC testů	40	0	40
Konečná přijatelnost barvení: n/N (%) (95 % interval spolehlivosti)	2746/2753 (99,7) (99,5, 99,9)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2838/2852 (99,5) (99,2, 99,7)

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Jestliže pozitivní kontroly vykazují slabší zbarvení, než se očekává, měly by být zkontrolovány během stejného cyklu na automatu další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů.
- Jestliže je pozitivní kontrola negativní, je třeba zkontrolovat, zda je preparát opatřen správným čárovým kódem. Jestliže je sklíčko opatřeno správným štítkem, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby bylo možné stanovit, zda je uvedené způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů. Odběr, fixace nebo odstraňování parafinů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.
- Pokud není odstraněn veškerý parafin, tkáň se nemusí obarvit. Je třeba opakovat postup odstranění parafinu z tkání.
- Pokud je barvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, cyklus je třeba zopakovat se zkrácenou inkubační dobou, dokud není dosaženo požadované intenzity barvení.
- Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní sklíčka nabitá kladným nábojem.

- Pokud je u karcinomu žaludku přítomno obarvení jader a cytoplazmy normální sliznice v těsné blízkosti oblasti nádoru, které znesnadňuje interpretaci obarvení membrán, případ lze analyzovat za použití hybridizace in situ (ISH).
- Nápravná opatření jsou uvedena v části Jednotlivé kroky postupu a v návodu k obsluze přístroje; případně se obraťte na své místní servisní zastoupení.

LITERATURA

- Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
- Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.

5. Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
6. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. Mayo Clin Proc. 1994;69: 57-58.
7. Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. Br J Cancer. 1997;75: 667-1673.
8. Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. J Pathol. 1990;161:15-25.
9. Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. Eur J Cancer. 1993;29A:1018-1023.
10. DePotter CR, 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.
11. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
12. 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.
13. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
14. 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.
15. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008;52:797-805.
16. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
17. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
18. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
19. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
20. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
21. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization, Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
22. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
23. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomicic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.
24. Rhodes A, Sarson J, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. Am J Clin Pathol. 2010;134(4): 621-32.
25. van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2 status in breast cancer. Mod Pathol. 2009;22(7):879-886.
26. Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neu Test 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). Virchows Arch. 2009;454(3):241-8 (Epub: 24 Jan 2009).
27. Itoh H, Kato N, Serizawa A, Itoh T, Umemura S, Osamura RY. HER2 Rabbit Monoclonal Antibody 4B5 and Silver SISH: High Performance in Surgical Pathology for Appropriate Patient Care. Laboratory Investigation. 2009;89(1): 48A.
28. Powell WC, Roche PC, Tubbs RR. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2008;16(6):569.
29. Carbone A, Botti G, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. J Mol Diagn. 2008;10(6): 527-36.
30. Wolff AC, Hammond ME, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med. 2007;131(1):18.
31. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
32. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.
33. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
34. <http://www.kadcyla.com/hcp>
35. <http://www.perjeta.com/hcp>

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView*, PATHWAY, VENTANA a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche.

Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ INFORMACE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com