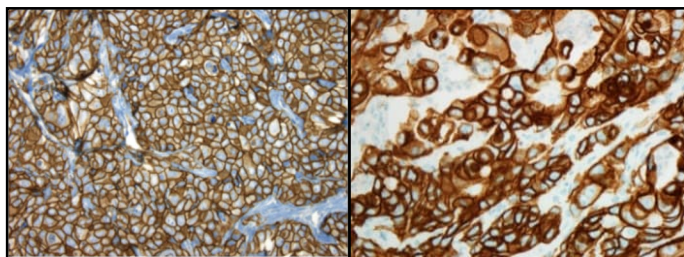


VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

REF 790-7167

09670564001

IVD  50



Obr. 1. Barvení s králíčí monoklonální primární protilátkou VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx u karcinomu prsu.

Obr. 2. Barvení 3+ s králíčí monoklonální primární protilátkou VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx u karcinomu žaludku.

URČENÉ POUŽITÍ

Králíčí monoklonální primární protilátka VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx je určena k semikvantitativní imunohistochemické (IHC) detekci antigenu HER2 v řezech tkáně prsu a žaludku, fixované formalínem, zalité parafínem, které jsou obarveny na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Tento IHC prostředek je indikován jako doprovodný diagnostický prostředek k identifikaci pacientů s rakovinou prsu, kteří jsou způsobilí pro léčbu trastuzumabem (IHC 3+ nebo IHC 2+ / ISH amplifikovaný), pertuzumabem (IHC 3+ nebo IHC 2+ / ISH amplifikovaný), trastuzumabem emtansinem (IHC 3+ nebo IHC 2+ / ISH amplifikovaný) nebo trastuzumabem deruxtekanem (IHC 1+ nebo IHC 2+ / ISH neamplifikovaný). Kromě toho je tento prostředek IHC indikován jako doprovodné diagnostické zařízení při identifikaci pacientů s rakovinou žaludku, u nichž se zvažuje léčba trastuzumabem (IHC 3+ nebo IHC 2+ / ISH amplifikovaný).

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

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Protilátka VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (test VENTANA HER2 (4B5) Assay) je králíčí monoklonální protilátka (klon 4B5) namířená proti vnitřní doméně lidského receptoru 2 epidermálního růstového faktoru (HER2). Receptor HER2 byl naklonován a charakterizován.¹ Ukázalo se, že klon 4B5 reaguje se 185kDa proteinem z lysátů buněk SK-BR-3 prostřednictvím Western blottingu. SK-BR-3 je buněčná linie karcinomu prsu, která má 128násobně vyšší expresi mRNA HER2.² Velikost identifikovaného pásu dobře koreluje s velikostí uváděnou pro protein HER2 (185 kDa).¹ Imunohistochemické (IHC) experimenty s transfektovanými buněčnými liniemi (HEK293) ukázaly, že klon 4B5 barví buňky transfektované s HER2 a buňky transfektované s HER4, ačkoli nebylo pozorováno žádné barvení buněk transfektovaných s HER1 nebo HER3; data z testu Western blot s rekombinantním proteinem HER4 rovněž naznačila, že klon 4B5 rozpoznává epitop HER4.³ Přesto nebyla pozorována zkřížená reakce HER2 (4B5) s HER4 při IHC barvení prsní tkáně fixované formalínem, zalité parafínem (FFPE).⁴ HER2 je transmembránový tyrosínkinázový receptor, který je strukturně podobný receptoru epidermálního růstového faktoru.^{5,6} Genová amplifikace a odpovídající nadměrná exprese HER2 byly zjištěny u řady tumorů, včetně karcinomu prsu.^{5,6,7} Nadměrná exprese proteinu v důsledku amplifikace genu HER2 je primárním faktorem tumorigeneze zprostředkované HER2.⁵ Genová amplifikace obvykle vede k výraznému zvýšení počtu receptorů HER2 na buněčné membráně.^{5,6} Nadměrná exprese HER2

zvyšuje signální transdukci a reguluje proliferaci a diferenciaci, což v konečném důsledku způsobuje tvorbu nádoru.^{5,6}

V případě absence genové amplifikace bylo pozorováno spektrum exprese proteinu HER2.⁸ Bylo navrženo několik faktorů, které vysvětlují přechodné úrovně exprese proteinu HER2 v případech rakoviny prsu při absenci genové amplifikace, včetně vzájemného ovlivňování signálních drah HER2 a estrogenových receptorů.^{8,9} Exprese proteinu HER2, která není považována za nadměrnou expresi, může být klasifikována jako nízká exprese HER2.^{8,10,11}

U adenokarcinomu žaludku a gastroezofageální junkce dochází k nadměrné expresi proteinu HER2 a/nebo genové amplifikaci.^{12,13,14} V publikovaných studiích bylo zaznamenáno široké rozmezí četnosti nadměrné exprese HER2. Nicméně jeden z největších screeningových datových souborů, který zahrnoval 3803 pacientů s adenokarcinomem žaludku a gastroezofageální junkce, uváděl, že pozitivní test na nadměrnou expresi proteinu HER2 nebo genovou amplifikaci mělo 22 % pacientů.¹⁵

KLINICKÝ VÝZNAM

Rakovina prsu je celosvětově nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen.¹⁶ Včasná detekce a vhodná volba léčby mohou významně ovlivnit celkové přežití.^{7,17} Přibližně 15 až 30 % invazivních ductálních karcinomů prsu je pozitivních na HER2.^{7,10} Téměř všechny případy Pagetovy choroby prsu a až 90 % případů ductálního karcinomu *in situ* komedonového typu jsou pozitivní.^{18,19} Stav positivity na HER2 již více než 20 let definuje podskupinu pacientů s rakovinou prsu, kteří mají prospěch z léčby cílené na HER2.^{7,17} Populace pozitivní na HER2 byla historicky definována jako ti pacienti, kteří vykazují nadměrnou expresi proteinu HER2 hodnocenou imunohistochemicky (IHC) na základě semikvantitativního hodnoticího systému IHC (0, 1+, 2+ a 3+) a/nebo genovou amplifikaci hodnocenou pomocí hybridizace *in situ* (ISH).¹⁷ Pozitivita na HER2 byla silně korelována s nadměrnou expresí proteinu (IHC skóre 3+). V případech s hraniční nadměrnou expresí (IHC skóre 2+, nejednoznačné) může být vyžadován potvrzující reflexní test k posouzení genové amplifikace podle zavedeného algoritmu posuzování HER2.¹⁷

Léčivé přípravky, které jsou na trhu, včetně přípravku Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) a KADCYLA (ado-trastuzumab emtansin / trastuzumab emtansin), prokázaly klinický přínos u pacientů s rakovinou prsu pozitivní na HER2 tím, že zastavily a v některých případech zvrátily růst karcinomu.^{20–24} Trastuzumab a pertuzumab jsou humanizované monoklonální protilátky, které se vážou na protein HER2 na povrchu buněk a narušují signální transdukci zprostředkovanou HER2.^{20,24,25} Trastuzumab emtansin je konjugát protilátky a léku složený z trastuzumabu a cytotoxické látky DM1 konjugované přes nerozštěpitelný linker.²³ Z léčby trastuzumabem (Herceptin), pertuzumabem (PERJETA) nebo trastuzumabem emtansinem (KADCYLA) by měly mít prospěch pouze pacienti s rakovinou prsu pozitivní na HER2 (IHC skóre 3+ nebo 2+ s potvrzeným amplifikovaným stavem HER2).^{16,18}

Přibližně 40 až 50 procent pacientů s rakovinou prsu má tumory, které nevykazují amplifikaci genu HER2 a nadměrně neexprimují receptor, nicméně jsou u nich zjištěny nízké úrovně exprese HER2.^{8,10} Případy s nízkou expresí HER2 (IHC skóre 1+ nebo 2+ (s potvrzeným neamplifikovaným stavem HER2)) jsou obvykle považovány za negativní na HER2 a jsou vyloučeny z možnosti léčby cílené na HER2.⁸ Nedávno byl pozorován přínos léčby s protilátkou HER2 a s trastuzumabem deruxtekanem (ENHERTU®) u pacientů s rakovinou prsu s nízkými úrovněmi exprese HER2.^{26,27} Trastuzumab deruxtekan je konjugát protilátky a léku, který obsahuje bázi monoklonální protilátky cílené na HER2 (trastuzumab), štěpitelný linker a buněčnou membránou propustnou pro derivát exatekanu (užitečná náplň inhibitoru topoizomerázy I).¹⁰

Diagnostika *in vitro* pro hodnocení stavu HER2 u pacientů s rakovinou prsu je důležitou pomůckou pro lékaře při určování léčby trastuzumabem (Herceptin), pertuzumabem (PERJETA), trastuzumabem emtansinem (KADCYLA) nebo trastuzumabem deruxtekanem (ENHERTU®).¹⁷ Detekce exprese proteinu HER2 pomocí IHC se používá jako pomůcka při hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u nichž se zvažuje léčba cílená na HER2 trastuzumabem (Herceptin), pertuzumabem (PERJETA), trastuzumabem emtansinem (KADCYLA) nebo trastuzumabem deruxtekanem (ENHERTU®). Rakovina žaludku je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním a celosvětově je hlavní příčinou úmrtí na rakovinu.¹³ Nejčastějším způsobem léčby rakoviny žaludku je chirurgický zákrok.^{14,28} Většina případů rakoviny žaludku je však detekována v pokročilém stadiu a operace je často obtížně proveditelná.^{14,28} K léčbě pokročilé rakoviny žaludku se používá chemoterapie, i když přežití těchto pacientů je velmi nízké.^{14,28} Léčba cílená na HER2 trastuzumabem je základem léčby invazivního

karcinomu prsu a má terapeutický význam i v léčbě pacientů s rakovinou žaludku s nadměrnou expresí tohoto receptoru.^{12,14} Průkaz amplifikace genu HER2 a/nebo nadměrné exprese proteinu je zásadní pro výběr pacientů pro léčbu trastuzumabem.^{12,14} Klinické studie prokázaly, že pacienti s rakovinou prsu nebo žaludku s vysokou nadměrnou expresí proteinu HER2 a/nebo genovou amplifikací mají z léčby trastuzumabem největší prospěch.^{12,21} Detekce exprese proteinu HER2 na základě IHC se používá jako pomůcka při hodnocení pacientů s rakovinou žaludku, u nichž se zvažuje léčba trastuzumabem (Herceptin).

PRINCIP POSTUPU

Test VENTANA HER2 (4B5) Assay obsahuje králičí monoklonální protilátku, která se váže na HER2 v řezech tkáně FFPE. Specifickou protilátku lze lokalizovat pomocí konjugátu sekundární protilátky a HRP (*ultraView Universal DAB Detection Kit*). Specifický komplex protilátky a enzymu je poté vizualizován produktem precipitační enzymové reakce. Každý krok se inkubuje po přesnou dobu a při přesné teplotě. Na konci každého inkubačního kroku přístroj promyje řezy, aby zastavil reakci a odstranil nenavázaný materiál, který by bránil žádoucí reakci v následných krocích. Přístroj také nanese kapalně krycí skličko Liquid Coverslip, které minimalizuje odpařování vodných reagentů ze sklička se vzorkem. Klinické případy by měly být hodnoceny v kontextu výkonu příslušných kontrol. Doporučuje se zahrnout pozitivní kontrolu tkáně fixovanou a zpracovanou stejným způsobem jako patientský vzorek (například slabě pozitivní karcinom prsu). Kromě obarvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay by mělo být provedeno obarvení druhého sklička s negativní kontrolou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby byl test považován za platný, měla by tkáň pro pozitivní kontrolu vykazovat barvení membrány nádorových buněk. Tyto složky by měly být negativní, pokud jsou barveny s CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Kromě toho se doporučuje, aby pro každou dávku vzorků zpracovaných a analyzovaných na přístroji BenchMark IHC/ISH bylo zahrnuto skličko s negativní kontrolní tkání (například karcinom prsu nebo žaludku negativní na HER2). Tato negativní kontrolní tkáň by měla být obarvena s testem VENTANA HER2 (4B5) RxDx, aby bylo zajištěno, že zesílení antigenu a další postupy před ošetřením nevytvoří falešně pozitivní barvení.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Test VENTANA HER2 (4B5) Assay obsahuje dostatek reagentů pro 50 testů. Jeden 5mL dávkovač testu VENTANA HER2 (4B5) Assay obsahuje přibližně 30 µg králičí monoklonální protilátky namířené proti lidskému antigenu HER2.

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

Koncentrace specifické protilátky je přibližně 6 µg/mL.

Test VENTANA HER2 (4B5) Assay obsahuje králičí IgG zředěné ze supernatantů tkáňové kultury.

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

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

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

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

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

1. Doporučená kontrolní tkáň
2. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. č. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView* DAB Detection Kit (kat. č. 760-500 / 05269806001)
5. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 0527971001)
6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
8. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)

11. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
13. Obecné laboratorní vybavení
14. Přístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

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

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

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

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně FFPE zpracované běžným způsobem.

Doporučeným fixativem na tkáň je 10% neutrální pufovaný formalin.²⁹ Sklička je třeba obarvit neprodleně, neboť antigenost připravených tkáňových řezů se může postupem času snižovat.

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

Je třeba připravit řezy o tloušťce přibližně 4 µm a ty položit na sklička. Sklička by měla být Superfrost Plus nebo ekvivalentní. Studie ukazují, že řezy tkání a buněčných linií, které jsou sušené na vzduchu a skladované při teplotě 2–8 °C, jsou stabilní po dobu minimálně 45 dnů. Každá laboratoř by měla validovat stabilitu sklička s řezem pro své vlastní postupy a podmínky prostředí pro skladování.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
4. Kladně nabitá sklička mohou být citlivá na zátěž prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy sklíček.
5. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s biologicky nebezpečným materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrnicemi odpovídajícími orgánů.^{30,31}
6. Zabraňte kontaktu reagentů s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
7. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentů, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
8. Při použití podle pokynů není tento produkt klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervačním prostředkem v reagentii je azid sodný. Symptomy nadměrné expozice azidu sodnému mohou zahrnovat podráždění kůže a očí, podráždění sliznic a podráždění horních cest dýchacích. Koncentrace azidu sodného v tomto produktu je menší než 0.05 % a nesplňuje kritéria pro nebezpečnou látku. Usazeniny Na₃N mohou reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody, aby nedocházelo ke hromadění azidu v potrubí.³² U citlivých jedinců jsou možné systémové alergické reakce.
9. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách navifyportal.roche.com.
10. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
11. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
12. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

POSTUP BARVENÍ

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty pro použití na přístrojích BenchMark IHC/ISH společně s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Doporučené barvicí protokoly uvádějí tabulky níže.

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

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

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkládacímu dávkovači (P/N 790-7167).

POZNÁMKA: Postupy barvení shrnuje Tab. 1 (pro posouzení pozitivitu na HER2 a nízké úrovně exprese HER2 v případech rakoviny prsu), Tab. 2 (pouze pro posouzení pozitivitu na HER2 v případech rakoviny prsu) a Tab. 3 (pro posouzení pozitivitu na HER2 v případech rakoviny žaludku). Doporučené kroky barvicího protokolu, včetně úpravy buněk a inkubace protilátek, jsou stejné pro všechna vyšetření rakoviny prsu s expresí HER2; postupy barvení však mají k dispozici různé úrovně uživatelských změn. Při vyšetření pacientů pro posouzení potenciální nízké úrovně exprese HER2 je třeba použít postup barvení uvedený v Tab. 1. Pokud je záměrem vykázat stav nízké úrovně exprese HER2 (definovaný jako IHC skóre 1+ nebo 2+ (s potvrzeným neamplifikovaným stavem HER2)), musí být použit postup barvení, který uvádí Tab. 1. Pokud je záměrem pouze vykázat stav pozitivitu HER2 (definovaný jako IHC skóre 3+ nebo 2+ s potvrzeným amplifikovaným stavem HER2), lze použít postupy uvedené v Tab. 1 nebo Tab. 2. Aby bylo zajištěno co nejkomplexnější využití výsledků pro zjištění nízké úrovně exprese HER2 nebo potvrzení pozitivitu na HER2 u případů rakoviny prsu, důrazně se doporučuje použít postup barvení, který uvádí Tab. 1.

Postup barvení pro všechna posouzení HER2 včetně posouzení potenciální nízké úrovně exprese HER2 ve vzorcích prsu

Barvicí protokol a postup barvení uvedený v této části a v Tab. 1 jsou vhodné pro použití ve všech případech vyšetření rakoviny prsu s expresí HER2 a musejí být použity při hodnocení patientských vzorků pro potenciální terapii při nízké úrovni exprese HER2. Odchylna od doporučeného barvicího protokolu může vést k nepřijatelnému barvení vzorků s HER2 se změněným skóre HER2, zejména v případech s nízkou expresí HER2 (IHC 1+). Zejména zkrácení nebo prodloužení doby úpravy buněk pravděpodobně povede ke vzniku vzorků obarvených s HER2 se změněným skóre HER2, což může vést k nevhodným rozhodnutím o léčbě pacientů. Postup barvení, který uvádí Tab. 1, neumožňuje změnu doby úpravy buněk nebo doby inkubace protilátek, která by pomohla zmírnit toto riziko, protože se jedná o jediný barvicí protokol validovaný pro použití při posuzování patientských vzorků s potenciální nízkou úrovní exprese HER2.

Tab. 1. Barvicí protokol pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay pro veškeré posouzení HER2 ve vzorcích prsu, včetně posouzení potenciální nízké úrovně exprese HER2 na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA nebo BenchMark ULTRA PLUS
Postup barvení	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Protilátka (primární)*	VENTANA HER2 4B5 Ab – 16 min. nebo CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig – 16 min.	VENTANA HER2 4B5 Ab – 16 min. nebo CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig – 16 min.	VENTANA HER2 4B5 Ab – 12 min. nebo CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig – 12 min.
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty		

* Jedná se o předem naprogramovaný stav, uživatel si tento krok nemůže zvolit.

Alternativní postupy barvení použitelné pouze pro posouzení potenciální pozitivitu na HER2 u vzorků prsu a žaludku

Postupy barvení a barvicí protokoly, které uvádí Tab. 2 a Tab. 3, jsou určeny k použití při posuzování pozitivitu na HER2 (definované jako nadměrná exprese proteinu, IHC skóre 3+ nebo 2+ (s potvrzeným amplifikovaným stavem HER2)), a nikoliv při posuzování nízké úrovně exprese HER2 (definované jako IHC skóre 1+ nebo 2+ (s potvrzeným neamplifikovaným stavem HER2)). Doporučené doby úpravy buněk a inkubace protilátek, které jsou podrobně uvedeny v Tab. 2 a Tab. 3, nejsou pevně dané a uživatel je může změnit. Mezi možné důvody pro změnu parametrů patří odchylky ve fixaci a zpracování tkání (odchylky od doporučené fixace nebo zpracování vzorků), obecné podmínky laboratorního přístroje a prostředí a preference hodnotitelů. Další informace o proměnných fixace naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).³³ Uživatelé, kteří se odchýlí od doporučených barvicích protokolů, jsou zodpovědní za interpretaci a validaci výsledků u patientských vzorků.

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s detekční soupravou *ultraView DAB Detection Kit* u vzorků prsu na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA nebo BenchMark ULTRA PLUS
Postup barvení	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, mírné	CC1, mírné	ULTRA CC1, mírné
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	16 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Zvoleno		
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing (modření), 4 minuty		

Tab. 3. Doporučený barvicí protokol pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s detekční soupravou *ultraView DAB Detection Kit* u vzorků žaludku na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Postup barvení	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>	Postup barvení <i>ultraView DAB</i>
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno	Zvoleno
Cell Conditioning (Odmaskování antigenu)	CC1, mírné	CC1, mírné	ULTRA CC1, mírné
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	16 minut, 37 °C	12 minut, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Zvoleno		
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty		
Po kontrastním barvení	Bluing (modření), 4 minuty		

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Kontroly řady buněk

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

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

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

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

POZITIVNÍ KONTROLNÍ TKÁŇ

Tkáň pro pozitivní kontrolu, fixovaná a zpracovaná stejným způsobem jako patientské vzorky, musí být analyzována pro každou sadu podmínek testu a při každém provedeném postupu barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay. Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako testovanou tkáň. Při nanášení reagentie na sklíčko pak lze snadno zjistit případné závady. Pro kontrolu kvality je nejvhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením. Kontrolní tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené prvky a sloužit pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkání by měl být čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo vzorky z operace, zpracované a fixované co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy.

Taková tkáň může sledovat všechny kroky analýzy, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného odlišně od testovaného vzorku poskytuje kontrolu všech reagentií a kroků metody kromě fixace a přípravy tkáně. V ideálním případě by měla být vybrána tkáň, o které je známo, že má slabé, ale pozitivní zbarvení, aby se potvrdilo, že je systém citlivý i na nízké míry degradace reagentií či na problémy s metodikou IHC. Obecně je však neoplastická tkáň, která je pozitivní na HER2, silně pozitivní vzhledem k povaze patologie (nadměrná exprese).

Známé pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce reagentií a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy testovaných vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Příkladem pozitivní kontroly pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay je invazivní karcinom prsu se známou slabou pozitivitou na HER2 anebo slabě pozitivní vzorek karcinomu žaludku. Složky tkáně s pozitivním zbarvením (membránové zbarvení neoplastických buněk) se používají k potvrzení, že byla použita protilátka a že přístroj správně fungoval.

Negativní kontrola tkáně

Stejně sklíčko použité pro pozitivní kontrolu tkáně (duktální nebo lobulární invazivní karcinom prsu nebo karcinom žaludku) může být použito i jako negativní kontrola tkáně. Složky bez zbarvení (okolní stroma, lymfoidní buňky a krevní cévy) by měly vykazovat nepřítomnost specifického zbarvení a poskytnout indikaci specifického zbarvení pozadí (falesně pozitivní) s primární protilátkou. Použijte známou negativní tkáň, fixovanou, zpracovanou a zalitou stejným způsobem jako patientský vzorek.

Negativní reagenční kontrola

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

Nevysvětlitelné rozpory

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

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře je třeba ověřit specifitu protilátky jejím testováním na řadě tkání se známými imunochemickými funkčními charakteristikami reprezentujícími známé pozitivní a negativní tkáně (viz Postupy kontroly kvality uvedené v této části příbalové informace a doporučení pro kontrolu kvality v dokumentu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,³⁴ nebo CLSI Approved Guideline³⁵, případně v obou dokumentech). Postupy kontroly kvality je třeba opakovat pro každou novou šarží protilátky nebo vždy, když dojde ke změně parametrů testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně karcinomu prsu a žaludku se známým stavem HER2.

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

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

Pozitivní kontroly

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

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

Negativní kontrolní tkáně

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

Negativní reagenční kontroly

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

Tkáň pacienta

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

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

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

Následující tabulky uvádějí kritéria barvení. Podrobnější popis se snímky barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay naleznete v dokumentu příručka pro interpretaci algoritmu VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx pro rakovinu prsu a žaludku (P/N 1021957CS).

Tab. 5. Kritéria pro intenzitu a vzor barvení buněčné membrány s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu prsu při použití postupu barvení uvedeného v Tab. 1.

Vzor barvení	Skóre HER2 (4B5) (hlášení ošetřujícím lékařem)	Použití postupu barvení, který uvádí Tab. 1: Doporučený stav hlášení	Klinická aplikace
Nebylo pozorováno žádné zbarvení membrány nebo Slabé, částečné zbarvení membrány v podílu 10 % nebo méně rakoviných buněk	0	Negativní na HER2	Žádné
Slabé, částečné zbarvení membrány je větší než 10 % rakoviných buněk	1+	Nízká úroveň exprese HER2	ENHERTU® (trastuzumab deruxtekan)
Slabé až střední úplné zbarvení membrány u více než 10 % rakoviných buněk	2+*	Reflexní test: HER2 neamplifikován 0	
	2+*	Reflexní test: HER2 amplifikováno	
Intenzivní úplné zbarvení membrány u více než 10 % rakoviných buněk	3+	Pozitivní / nadměrná exprese HER2	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansin)

* Doporučení reflexního testu k posouzení genové amplifikace podle pokynů ASCO/CAP

Tab. 6. Kritéria pro intenzitu a vzor barvení buněčné membrány s testem VENTANA HER2 (4B5) Rx/Dx Assay u karcinomu prsu při použití postupu barvení uvedeného v Tab. 2.

Vzor barvení	Skóre HER2 (4B5) (hlášení ošetřujícím lékařem)	Použití postupu barvení, který uvádí Tab. 2: Doporučený stav hlášení	Klinická aplikace
Nebylo pozorováno žádné zbarvení membrány nebo Slabé, částečné zbarvení membrány v podílu 10 % nebo méně rakoviných buněk	0	Negativní na HER2	Žádné
Slabé, částečné zbarvení membrány je větší než 10 % rakoviných buněk	1+	Negativní na HER2	
Slabé až střední úplné zbarvení membrány u více než 10 % rakoviných buněk	2+*	Reflexní test: HER2 neamplifikován 0	
	2+*	Reflexní test: HER2 amplifikováno	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansin)

Vzor barvení	Skóre HER2 (4B5) (hlášení ošetřujícím lékařem)	Použití postupu barvení, který uvádí Tab. 2: Doporučený stav hlášení	Klinická aplikace
Intenzivní úplné zbarvení membrány u více než 10 % rakoviných buněk	3+	Pozitivní / nadměrná exprese HER2	KADCYLA (trastuzumab emtansin)

* Doporučení reflexního testu k posouzení genové amplifikace podle pokynů ASCO/CAP

Konvence při hodnocení pro interpretaci výsledků protilátky VENTANA anti-HER2 (4B5) u karcinomu žaludku

Karcinomy žaludku, které jsou považovány za pozitivní na nadměrnou expresi proteinu HER2, musejí splňovat prahová kritéria pro intenzitu a vzor barvení membrány (2+ nebo vyšší na stupnici od 0 do 3+) a procento pozitivních nádorových buněk. Barvení musí být lokalizováno na buněčné membráně, ale nemusí být zcela po obvodu, neboť bazolaterální barvení je běžně pozorováno a mělo by být vzato v úvahu pro hodnocení. Může být přítomno zbarvení cytoplazmy a/nebo jádra, ale toto zbarvení není do stanovování positivity zahrnuto. U karcinomu žaludku procento pozitivních nádorových buněk závisí na tom, zda je vzorkem vzorek z biopsie (≥ 5 kohezivních buněk) nebo vzorek z resekce (≥ 10 %).

Při zavádění pokynů pro hodnocení je u imunohistochemie HER2 v karcinomu žaludku třeba poznamenat, že i když je silné membránové zbarvení důkazem nadměrné exprese proteinu HER2 v neoplastických buňkách, nemusí být zcela obvodové.³⁶

U rakoviny žaludku bylo hlášeno difúzní cytoplazmatické zbarvení s jaderným zbarvením nebo bez jaderného zbarvení.³⁷ Při stanovování exprese proteinu HER2 u rakoviny žaludku by mělo být použito pouze membránové zbarvení.

Imunohistochemické barvení s klonem 4B5 může v karcinomu žaludku a karcinomu gastroezofageální junkce způsobit cytoplazmatické i jaderné zbarvení běžné žaludeční sliznice a méně často neoplastických buněk. Povaha tohoto cytoplazmatického a jaderného zbarvení není v současné době známa. Tento vzor barvení by neměl být zaměňován s diskrétním membránovým zbarvením, protože to svědčí o pozitivitě HER2 v neoplastických buňkách.

Podrobnější popis s mikrofotografiemi barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay naleznete v dokumentu Příručka pro interpretaci algoritmu VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Rx/Dx pro rakovinu prsu a žaludku (P/N 1021957CS).

Tab. 7. Kritéria pro intenzitu a vzor barvení buněčné membrány s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu žaludku při použití postupu barvení uvedeného v Tab. 3.

Vzor barvení – vzorek z resekce	Vzor barvení – vzorek z biopsie	Skóre (hlášení ošetřujícímu lékaři)	Hodnocení obarvení HER2	Klinická aplikace
Žádná reaktivita ani membránová reaktivita u < 10 % nádorových buněk	Žádná reaktivita ani membránová reaktivita u žádné nádorové buňky	0	Negativní na HER2	Žádné
Slabá / sotva znatelná membránová reaktivita u ≥ 10 % nádorových buněk; buňky jsou reaktivní pouze na části své membrány	Shluk* nádorových buněk se slabou / sotva znatelnou membránovou reaktivitou bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	1+	Negativní na HER2	
Slabá až střední úplná, bazolaterální nebo laterální membránová reaktivita u ≥ 10 % nádorových buněk	Shluk* nádorových buněk se slabou až střední úplnou, bazolaterální nebo laterální membránovou reaktivitou bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	2+** Reflexní test: HER2 neamplifikováno	Negativní na HER2	
		2+** Reflexní test: HER2 amplifikováno	Pozitivní / nadměrná exprese HER2	HERCEPTIN (trastuzumab)
Silná úplná, bazolaterální nebo laterální membránová reaktivita u ≥ 10 % nádorových buněk	Shluk* nádorových buněk se silnou úplnou, bazolaterální nebo laterální membránovou reaktivitou bez ohledu na procento obarvených nádorových buněk	3+	Pozitivní / nadměrná exprese HER2	

* ≥ 5 kohezivních buněk

** Doporučen reflex na ISH

OMEZENÍ

Obecná omezení

- Imunohistochemie je vícestupňový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných reagentů, výběru tkání, fixaci, zpracování, v přípravě imunohistochemického sklíčka a v interpretaci výsledků barvení.
- Barvení tkáně závisí na zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi či tekutinami mohou způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek metod fixace a zalévání nebo z inherentních nepravdivostí v tkáni.
- Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
- Klinická interpretace pozitivního zabarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfolgie a dalších histopatologických kritérií. Klinický výklad jakéhokoli zabarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněn morfologickými studiemi a vhodnými kontrolami, jakož i dalšími diagnostickými testy. Je odpovědností kvalifikovaného patologa seznámit se s protilátkami, reagenty a metodami používání k interpretaci obarveného přípravku. Barvení musí být prováděno v certifikované a licencované laboratoři pod dohledem patologa, který je odpovědný za kontrolu obarvených sklíčků a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Společnost VENTANA poskytuje protilátky a reagenty v optimálním ředění pro použití, pokud jsou dodrženy uvedené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může očekávané výsledky zneplatnit. Musejí být použity a zdokumentovány příslušné kontroly. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.
- Tento produkt není určen k použití v průtokové cytometrii, funkční charakteristiky nebyly stanoveny.
- Reagenty mohou v dřívě netestovaných tkáních vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávaných reakcí nelze zcela vyloučit ani u testovaných skupin tkání, a to z důvodu biologické variability exprese antigenu v neoplasmu nebo jiných patologických tkáních.³⁸ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní servisní zastoupení.

- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické zabarvení s křenuvou peroxidázou.³⁹
- Falešně pozitivní výsledky lze pozorovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce substrátu. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty), aktivitou endogenní peroxidázy (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (například: játra, mozek, prs, ledviny) v závislosti na typu použitého imunologického barvení.⁴⁰
- Negativní výsledek, stejně jako u jiných imunohistochemických testů, znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen.

Specifická omezení

- Tato protilátka byla optimalizována, jak uvádí Tab. 1 a Tab. 2, pro přístroje BenchMark a detekční chemizmy. Odchylky od doporučených barvicích protokolů, které uvádí Tab. 1 a Tab. 2, mohou vést k nepřijatelným vzorkům Negative Reagent Control (NRC) a vzorkům obarveným s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay se změněným skóre HER2. Prodloužená doba inkubace protilátky pravděpodobně způsobí nepřijatelné barvení v NRC, což by zabránilo vyhodnocení vzorku s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay. Zkrácená a prodloužená doba úpravy buněk pravděpodobně povede ke vzniku vzorků s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay se změněným skóre HER2, což může způsobit nevhodná rozhodnutí o léčbě pacientů. Další informace o různých proměnných fixaci naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).³³
- Protilátka v kombinaci s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežije rutinní fixaci formalinem, zpracování tkání a řezání. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci a validaci výsledků u pacientů.
- Sklíčka by měla být obarvena okamžitě, protože antigennost připravených tkáňových řezů se může v průběhu času snižovat a během dlouhodobého skladování může být ohrožena vlivy prostředí. Vzduchem osušená sklíčka by měla být vysušena a skladována při teplotě 2–8 °C. Studie potvrzují minimálně 45denní stabilitu antigenu na neobarvených sklíčcích. Pokud je požadováno datování po 45 dnech, měly by laboratoře validovat dataci expirace ve svém vlastním prostředí.
- Kostní dřev nebyla testována na specifitu. Uživatel by měl před interpretací informací o barvení určit vhodné barvení ve výše uvedených tkáních.
- Imunohistochemické barvení s klonem 4B5 může v karcinomu žaludku a karcinomu gastroezofageálního junkce způsobit cytoplazmatické i jaderné zbarvení běžné

žaludeční sliznice a méně často neoplastických buněk. Povaha tohoto cytoplazmatického a jaderného zbarvení není v současné době známa. Tento vzor barvení by neměl být zaměňován s diskretním membránovým zbarvením, které svědčí o pozitivitě HER2 v neoplastických buňkách.

6. Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.
7. Byly zaznamenány změny stavu HER2 při progresi metastáz nebo po neoadjuvantní chemoterapii. Na základě těchto pozorování může být opodstatněné získat čerstvý vzorek pro stanovení stavu HER2 v době léčby namísto spoléhání se na historický stav HER2.⁴¹

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

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

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Senzitivita a specifita

Senzitivita/specifita testu VENTANA HER2 (4B5) byla stanovena studií, která pro většinu běžných tkání neprokázala žádné specifické barvení membrány. Výsledky barvení jsou uvedeny v Tab. 8. Senzitivita a specifita testu VENTANA HER2 (4B5) Assay byla rovněž stanovena studií, která pro většinu neoplastických tkání neprokázala žádné specifické barvení membrány. Výsledky barvení jsou uvedeny v Tab. 9. Barvení pro senzitivitu a specifitu bylo provedeno pomocí protokolu pro detekční soupravu /VIEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT, případně protokolu pro detekční soupravu ultraView Universal DAB Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA.

Pozitivní barvení v epitelu mandlí, ezofageálním epitelu, prostatě, močovém měchýři, periferním nervu, příštítných těliscích, rakovině prsu, adenokarcinomu žaludku, tlustého střeva a rakoviny vaječníků je v souladu s publikovanou literaturou týkající se exprese HER2.

Tab. 8. Senzitivita/specifita testu VENTANA HER2 (4B5) Assay byla stanovena testováním běžných tkání FFPE.

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

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Žaludek	0/11	N/A	N/A

^a Fokální barvení povrchových epitelových buněk

^b Membránové zbarvení povrchových deštníkových buněk

^c Fokální barvení membrány

Tab. 9. Senzitivita/specifita testu VENTANA HER2 (4B5) Assay byla stanovena testováním řady neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	0/2
Meningiom (mozek)	0/1
Oligodendrogliom (mozek)	0/1
Serózní adenokarcinom (vaječník)	0/2
Karcinom, NOS (jinak neurčený) (vaječník)	1/2
Neuroendokrinní novotvar (slinivka)	0/1
Adenokarcinom (slinivka)	0/1
Karcinom NOS (slinivka)	0/3
Seminom (varle)	0/1
Embryonální karcinom (varle)	0/1
Medulární karcinom (štítná žláza)	0/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	0/1
Karcinom, NOS (štítná žláza)	0/3
Mikroinvazivní duktální karcinom (prs)	2/2
Invazivní duktální karcinom (prs)	44/98
Karcinom, NOS (prs)	1/4
Malobuněčný karcinom (plíce)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	0/1
Karcinom, NOS (plíce)	0/2
Adenokarcinom (plíce)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (jícen)	0/1
Adenokarcinom (jícen)	0/1
Mucinózní adenokarcinom (žaludek)	0/4
Adenokarcinom (žaludek)	8/88
Karcinom z prstenčitých buněk (žaludek)	0/4
Karcinom, NOS (žaludek)	0/3
Adenokarcinom (tenké střevo)	0/1
Gastrointestinální stromální tumor (tenké střevo)	0/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	0/32
Gastrointestinální stromální tumor (tlusté střevo)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Karcinom, NOS (tlusté střevo)	1/3
Adenokarcinom (konečník)	1/5
Gastrointestinální stromální tumor (konečník)	0/1
Melanom (konečník)	0/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	0/3
Hepatoblastom (játra)	0/1
Karcinom, NOS (játra)	0/3
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	0/1
Karcinom, NOS (ledvina)	0/5
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Karcinom, NOS (prostata)	0/3
Leiomyom	0/3
Adenokarcinom (děloha)	0/1
Karcinom z jasných buněk (děloha)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čípek)	0/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčně pruhovaný sval)	0/1
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	1/1
Neurofibrom (lumbální)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mezoteliom (peritoneum)	0/1
Pleomorfní rhabdomyosarkom (peritoneum)	0/1
Lymfom, NOS	0/3
Lymfom z B-buněk, NOS (slezina)	0/1
Lymfom z B-buněk, NOS (lymfatická uzlina)	0/2
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	0/1
Uroteliální karcinom (močový měchýř)	1/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	0/1
Osteosarkom (kost)	0/1
Leiomyosarkom (hladký sval)	0/1
Adenokarcinom konečníku (metastatický)	0/1
Adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	0/7
Mucinózní adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	0/1
Melanom	0/2
Neuroendokrinní neoplasmus, NOS	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Nediferencovaný karcinom, NOS	0/1

Analytická výkonnost u rakoviny prsu s nízkou úrovní exprese HER2

Opakovatelnost a mezilehlá preciznost pro nízkou úroveň exprese HER2 na přístroji BenchMark ULTRA

Do studie opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti bylo zahrnuto dvacet čtyř případů karcinomu prsu s rozsahem IHC barvení pro HER2. Design studie ověřil preciznost barvení na tkáních karcinomu prsu obarvených s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Tři šarže testu VENTANA HER2 (4B5) Assay (mezi šaržemi protilátek)

Tři šarže detekční soupravy *ultraView* DAB IHC Detection Kit (mezi šaržemi detekčních souprav)

V průběhu tří dnů (mezi dny)

Tři přístroje BenchMark ULTRA (mezi přístroji)

Napříč všemi podmínkami mezilehlé preciznosti (v rámci cyklu)

Každému vzorku byl přiřazen jeden režim na základě vzorku agregovaných pro jednotlivé testovací podmínky pro preciznost mezi šaržemi protilátek, mezi šaržemi detekčních souprav, mezi přístroji a mezi dny. U podmínky mezi cykly byly pro srovnání u každého vzorku připraveny duplicitní vzorky na jeden cyklus testu. Všechna sklička byla zasklepena a randomizována a poté hodnocena podle kritérií intenzity a vzoru barvení buněčné membrány pomocí barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tab. 5). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 10. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost testu VENTANA HER2 (4B5) Assay na tkáních z rakoviny prsu s hodnocením nízké úrovně exprese HER2

Opakovatelnost/ Preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi šaržemi protilátek	PPA	96/96	100.0	(96.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	144/144	100.0	(97.4, 100.0)
Mezi detekčními soupravami	PPA	93/96	96.9	(92.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	141/144	97.9	(94.4, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark ULTRA)	PPA	95/96	99.0	(96.7, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	143/144	99.3	(97.9, 100.0)
Mezi dny	PPA	94/96	97.9	(93.3, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	142/144	98.6	(95.8, 100.0)
V rámci cyklu	PPA	142/144	98.6	(96.5, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	214/216	99.1	(97.7, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: 95% oboustranný interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap z 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože podle designu klinického hodnocení nebyly způsobilé pro léčbu s nízkou úrovní exprese HER2; případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože podle designu klinického hodnocení byly způsobilé nebo potenciálně způsobilé pro cílenou léčbu s nízkou úrovní exprese HER2.

Srovnávací studie pro přístroje BenchMark ULTRA versus Benchmark XT a Benchmark GX pro nízkou úroveň exprese HER2

Do studie mezilehlé preciznosti bylo zahrnuto deset případů karcinomu prsu s rozsahem IHC barvení pro HER2. Design studie ověřil preciznost barvení na tkáňích karcinomu prsu obarvených s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay na více přístrojích a více platformách. Každému vzorku byl přiřazen jeden režim na základě vzorků agregovaných pro jednotlivé testovací podmínky. Pro srovnání byly u každého vzorku připraveny duplicitní vzorky na jeden cyklus testu. Všechna sklička byla zaslepena a randomizována a poté hodnocena podle kritérií intenzity a vzoru barvení buněčné membrány pomocí barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tab. 5). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 11.

Tab. 11. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost testu VENTANA HER2 (4B5) Assay na tkáňích z rakoviny prsu s hodnocením nízké úrovně exprese HER2

Opakovatelnost/ Preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi platformami (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mezi přístroji (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: 95% oboustranný interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap z 2000 vzorků bootstrap. Interval spolehlivosti CI pro 100% PPA, NPA a OPA byly vypočítány pomocí metody Wilsonova skóre.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože podle designu klinického hodnocení nebyly způsobilé pro léčbu s nízkou úrovní exprese HER2; případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože podle designu klinického hodnocení byly způsobilé nebo potenciálně způsobilé pro cílenou léčbu s nízkou úrovní exprese HER2.

Preciznost hodnotitele pro nízkou úroveň exprese HER2 na přístroji BenchMark ULTRA

Preciznost mezi hodnotiteli a preciznost u jednoho hodnotitele byly posouzeny vyhodnocením shody stavu nízké úrovně exprese HER2 mezi třemi hodnotiteli a u tří jednotlivých hodnotitelů. Studie zahrnovala 100 případů karcinomu prsu v rozsahu IHC barvení pro HER2. Vzorky byly před hodnocením stavu nízké úrovně exprese HER2 zaslepeny a randomizovány podle vzoru barvení buněčné membrány pomocí barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tab. 5). Hodnotitelé hodnotili všechny vzorky dvakrát s minimálně dvoutýdenním intervalem mezi jednotlivými čteními. Shodu pro preciznost mezi hodnotiteli a u jednoho hodnotitele shrnuje Tab. 12.

Tab. 12. Preciznost testu VENTANA HER2 (4B5) Assay s hodnocením nízké úrovně exprese HER2 u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli

Preciznost	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
U jednoho hodnotitele	APA	312/333	93.7	(90.9, 96.4)
	ANA	246/267	92.1	(88.0, 95.6)
	OPA	279/300	93.0	(90.0, 96.0)
Mezi hodnotiteli	APA	300/332	90.4	(85.8, 94.3)
	ANA	236/268	88.1	(82.1, 93.0)
	OPA	268/300	89.3	(84.7, 94.0)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: 95% oboustranný interval spolehlivosti (CI) byl vypočítán za použití metody percentilový bootstrap z 2000 vzorků bootstrap.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože podle designu klinického hodnocení nebyly způsobilé pro léčbu s nízkou úrovní exprese HER2; případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože podle designu klinického hodnocení byly způsobilé nebo potenciálně způsobilé pro cílenou léčbu s nízkou úrovní exprese HER2.

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro nízkou úroveň exprese HER2 na přístroji BenchMark ULTRA

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s cílem prokázat reprodukovatelnost testu pro určení stavu nízké úrovně exprese HER2 u případů karcinomu prsu. Studie zahrnovala 28 deidentifikovaných, archivních vzorků tkáně karcinomu prsu FFPE, které byly analyzovány na třech přístrojích BenchMark ULTRA každý den z pěti po sobě nenásledujících dnů v období 20 dnů ve třech externích laboratořích. Vzorky představovaly rozsah barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Každá sada 5 obarvených sklíček pro jeden vzorek a jeden den barvení byla randomizována a hodnocena celkem 6 hodnotiteli (2 hodnotitelé na pracovišti) z hlediska stavu nízké úrovně exprese HER2. Výsledky stavu nízké úrovně exprese HER2 u všech hodnotitelů, pracovišť a dnů pro vzorky byly spojeny a analyzovány oproti režimům hodnotitelů pro stejné vzorky, aby se stanovila celková reprodukovatelnost stavu nízké úrovně exprese HER2. Souhrn mír shod ve všech hodnotitelných pozorováních s použitím režimů hodnotitele na úrovni vzorku pro stav nízké úrovně exprese HER2 se v Tab. 13 uvádí jako odkaz.

Tab. 13. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro celkové míry shod pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s hodnocením nízké úrovně exprese HER2

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Celková	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
V rámci pracoviště	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
U jednoho hodnotitele	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)

Poznámka: Pozitivní procentuální shoda (PPA), negativní procentuální shoda (NPA), celková procentuální shoda (OPA).

Poznámka: 95% oboustranné intervaly spolehlivosti CI byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap s 2000 replikátů.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože podle designu klinického hodnocení nebyly způsobilé pro léčbu s nízkou úrovní exprese HER2; případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože podle designu klinického hodnocení byly způsobilé nebo potenciálně způsobilé pro cílenou léčbu s nízkou úrovní exprese HER2.

Kromě toho byla provedena párová srovnání mezi pracovišti, mezi hodnotiteli a mezi dny pro stav nízké úrovně exprese HER2. Souhrn výsledků je uveden v Tab. 14. Tato data indikují reprodukovatelnost testu v 5 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů.

Tab. 14. Párové míry shod reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s hodnocením nízké úrovně exprese HER2

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti	APA	7884/8102	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	8240/8458	97.4	(95.7, 98.8)
	OPA	8062/8280	97.4	(95.5, 98.8)
Mezi hodnotiteli	APA	398/409	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	414/425	97.4	(95.6, 98.8)
	OPA	406/417	97.4	(95.5, 98.8)
Mezi dny	APA	1580/1620	97.5	(95.9, 98.9)
	ANA	1652/1692	97.6	(96.2, 98.9)
	OPA	1616/1656	97.6	(96.1, 98.9)

Poznámka: Průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA), celková procentuální shoda (OPA)

Poznámka: 95% oboustranné intervaly spolehlivosti CI byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap s 2000 replikátů

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože podle designu klinického hodnocení nebyly způsobilé pro léčbu s nízkou úrovní exprese HER2; případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože podle designu klinického hodnocení byly způsobilé nebo potenciálně způsobilé pro cílenou léčbu s nízkou úrovní exprese HER2.

Analytická výkonnost u případů prsu s nízkou úrovní exprese HER2

Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS pro nízkou úroveň exprese HER2

Studie shody k vyhodnocení rovnocennosti výkonu mezi přístrojem BenchMark ULTRA PLUS a přístrojem BenchMark ULTRA se zúčastnily tři laboratoře. Pro statistickou analýzu u nízké úrovně exprese HER2 bylo k analýze předběžně vybráno 160 případů (80 pozitivních a 80 negativních, včetně 16 hraničních případů) ještě před provedením hodnocení patologem. Sklíčka s tkáněmi ze všech případů byla obarvena pomocí negativní reagenční kontroly a testu VENTANA HER2 (4B5) Assay na přístroji BenchMark ULTRA v interní laboratoři společnosti Roche za použití doporučeného barvicího protokolu. Neobarvená sklíčka s tkáněmi ze všech případů byla náhodně a rovnoměrně rozdělena pro barvení na přístroji BenchMark ULTRA PLUS s použitím doporučeného barvicího protokolu VENTANA HER2 (4B5). Jeden hodnotitel na každém pracovišti, který neznal stav případu, hodnotil sklíčka obarvená na přístroji BenchMark ULTRA PLUS a stanovil stav HER2 (4B5). Výsledky byly analyzovány společností Roche. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 15.

Tab. 15. Souhrnná shoda stavu nízké úrovně exprese HER2 u případů obarvených testem VENTANA HER2 (4B5) Assay na přístroji BenchMark ULTRA versus BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Hodnotitel společnost i Roche = pozitivní, externí hodnotitel = pozitivní	Hodnotitel společnost i Roche = pozitivní, externí hodnotitel = negativní	Hodnotitel společnost i Roche = negativní, externí hodnotitel = pozitivní	Hodnotitel společnost i Roche = negativní, externí hodnotitel = negativní	Celkem
Pozitivní	272	13	25	11	321
Negativní	8	9	2	298	317
Celkem	280	22	27	309	638
Procento pozitivních % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	N/A
	n/N		% (95% CI)		
PPA	285/302		94.4 (91.6, 96.8)		
NPA	300/336		89.3 (84.3, 94.4)		
OPA	585/638		91.7 (88.5, 94.6)		

Poznámka: PPA = pozitivní procentuální shoda; NPA = negativní procentuální shoda; OPA = celková procentuální shoda.

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovaných podle koše kvalifikačního skóre IHC.

Poznámka: Souhrnná shoda zahrnuje všechny případy a hodnotitele ULTRA PLUS.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože nebyly způsobilé pro klinické hodnocení zkoumající rakovinu prsu s nízkou úrovní exprese HER2. Případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože byly pro klinického hodnocení způsobilé nebo potenciálně způsobilé.

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi – přístroj BenchMark ULTRA PLUS pro nízkou úroveň exprese HER2

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s cílem prokázat reprodukovatelnost testu pro určení stavu nízké úrovně exprese HER2 u případů karcinomu prsu.

Studie zahrnovala 28 deidentifikovaných, archivních vzorků tkáně karcinomu prsu FFPE, které byly analyzovány na třech přístrojích BenchMark ULTRA PLUS každý den z pěti po sobě nenásledujících dnů v období 20 dnů ve třech externích laboratořích. Vzorky představovaly rozsah barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Každá sada 5 obarvených sklíček pro jeden vzorek a jeden den barvení byla randomizována a hodnocena celkem 6 hodnotiteli (2 hodnotitelé na pracoviště) z hlediska stavu nízké úrovně exprese HER2. Výsledky stavu nízké úrovně exprese HER2 u všech

hodnotitelů, pracovišť a dnů pro vzorky byly spojeny a analyzovány oproti režimům hodnotitelů pro stejné vzorky, aby se stanovila celková reprodukovatelnost stavu nízké úrovně exprese HER2. Souhrn mír shod ve všech hodnotitelných pozorováních s použitím režimů hodnotitele na úrovni vzorku pro stav nízké úrovně exprese HER2 se v Tab. 16 uvádí jako odkaz.

Tab. 16. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro celkové míry shod pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu prsu s hodnocením nízké úrovně exprese HER2.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Primární analýza / celkové	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Pracoviště – stratifikováno	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Hodnotitel – stratifikováno	PPA	412/425	96.9	(94.8, 98.7)
	NPA	405/415	97.6	(94.9, 100.0)
	OPA	817/840	97.3	(95.2, 98.9)

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovanými podle koše kvalifikačního skóre případů.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože nebyly způsobilé pro klinické hodnocení zkoumající rakovinu prsu s nízkou úrovní exprese HER2. Případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože byly pro klinického hodnocení způsobilé nebo potenciálně způsobilé.

Kromě toho byla provedena párová srovnání stavu HER2 (4B5) mezi jednotlivými pracovišti, mezi hodnotiteli a mezi dny. Test je reprodukovatelný v 5 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů, viz souhrn, který uvádí Tab. 17.

Tab. 17. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro párové míry shod pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu prsu s hodnocením nízké úrovně exprese HER2.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti	APA	7982/8440	94.6	(90.3, 97.9)
	ANA	7902/8360	94.5	(90.6, 98.0)
	OPA	7942/8400	94.5	(90.5, 98.0)
Mezi hodnotiteli	APA	402/422	95.3	(91.7, 98.1)
	ANA	398/418	95.2	(91.8, 98.1)
	OPA	400/420	95.2	(91.9, 98.1)
Mezi dny	APA	1608/1688	95.3	(91.5, 98.2)
	ANA	1592/1672	95.2	(91.8, 98.2)
	OPA	1600/1680	95.2	(91.8, 98.2)

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovanými podle koše kvalifikačního skóre případů.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 0 a 3+ seskupeny jako negativní případy, protože nebyly způsobilé pro klinické hodnocení zkoumající rakovinu prsu s nízkou úrovní exprese HER2. Případy se skóre HER2 1+ a 2+ byly seskupeny jako pozitivní případy, protože byly pro klinického hodnocení způsobilé nebo potenciálně způsobilé.

Analytická výkonnost v případech prsu pozitivních na HER2

Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS pro pozitivitu na HER2

Studie shody k vyhodnocení rovnocennosti výkonu mezi přístrojem BenchMark ULTRA PLUS a přístrojem BenchMark ULTRA se zúčastnily tři laboratoře. Pro analýzu pozitivitu na HER2 je skóre HER2 IHC 2+ nebo 3+ definováno jako pozitivní na HER2 a skóre 0 nebo 1+ je definováno jako negativní na HER2. Pro statistickou analýzu u pozitivitu na HER2 bylo k analýze předběžně vybráno 160 případů (80 pozitivních a 80 negativních, včetně 16 hraničních případů) ještě před provedením hodnocení patologem. Sklička s tkáněmi ze všech případů byla obarvena pomocí negativní reagenční kontroly a testu VENTANA HER2 (4B5) Assay na přístroji BenchMark ULTRA v interní laboratoři společnosti Roche za použití doporučeného barvicího protokolu. Neobarvená sklička s tkáněmi ze všech případů byla náhodně a rovnoměrně rozdělena pro barvení na přístroji BenchMark ULTRA PLUS s použitím doporučeného barvicího protokolu VENTANA HER2 (4B5). Jeden hodnotitel na každém pracovišti, který neznal stav případu, hodnotil sklička obarvená na přístroji BenchMark ULTRA PLUS a stanovil stav HER2 (4B5). Výsledky byly analyzovány společností Roche. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 18.

Tab. 18. Souhrnná shoda stavu pozitivitu na HER2 u případů obarvených testem VENTANA HER2 (4B5) Assay na přístroji BenchMark ULTRA versus BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Hodnotitel společností i Roche = pozitivní, externí hodnotitel = pozitivní	Hodnotitel společností i Roche = pozitivní, externí hodnotitel = negativní	Hodnotitel společností i Roche = negativní, externí hodnotitel = pozitivní	Hodnotitel společností i Roche = negativní, externí hodnotitel = negativní	Celkem
Pozitivní	245	18	11	13	287
Negativní	6	13	5	327	351
Celkem	251	31	16	340	638
Procento pozitivních % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	N/A
	n/N		% (95% CI)		
PPA	(263/282)		93.3 (89.3, 96.6)		
NPA	(332/356)		93.3 (89.7, 96.5)		
OPA	(595/638)		93.3 (90.8, 95.6)		

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovanými podle koše kvalifikačního skóre IHC (0, 1+, 2+, 3+).

Poznámka: Souhrnná shoda zahrnuje všechny případy a hodnotitele ULTRA PLUS.

Poznámka: PPA = pozitivní procentuální shoda; NPA = negativní procentuální shoda; OPA = celková procentuální shoda.

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi – přístroj BenchMark ULTRA PLUS pro pozitivitu na HER2

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay s cílem prokázat reprodukovatelnost testu pro určení stavu pozitivitu na

HER2 u případů karcinomu prsu. Studie zahrnovala 28 deidentifikovaných, archivních vzorků tkáně karcinomu prsu FFPE, které byly analyzovány na třech přístrojích BenchMark ULTRA PLUS každý den z pěti po sobě následujících dnů v období 20 dnů ve třech externích laboratořích. Vzorky představovaly rozsah barvení s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Každá sada 5 obarvených sklíček pro jeden vzorek a jeden den barvení byla randomizována a hodnocena celkem 6 hodnotiteli (2 hodnotitelé na pracoviště) z hlediska stavu positivity na HER2. Výsledky stavu positivity na HER2 u všech hodnotitelů, pracovišť a dnů pro vzorky byly spojeny a analyzovány oproti režimům hodnotitelů pro stejné vzorky, aby se stanovila celková reprodukovatelnost stavu positivity na HER2. Souhrn mír shod ve všech hodnotitelských pozorováních s použitím režimů hodnotitele na úrovni vzorku pro stav positivity na HER2 se v Tab. 19 uvádí jako odkaz.

Tab. 19. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro celkové míry shod pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu prsu s hodnocením positivity na HER2.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Primární analýza / celkově	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Pracoviště – stratifikováno	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Hodnotitel – stratifikováno	PPA	413/420	98.3	(96.9, 99.5)
	NPA	412/420	98.1	(95.8, 100.0)
	OPA	825/840	98.2	(96.9, 99.4)

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovanými podle koše kvalifikačního skóre případů.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 IHC 0 a 1+ seskupeny jako negativní případy a případy se skóre HER2 IHC 2+ a 3+ byly seskupeny jako pozitivní případy.

Kromě toho byla provedena párová srovnání stavu HER2 (4B5) mezi jednotlivými pracovišti, mezi hodnotiteli a mezi dny. Test je reprodukovatelný v 5 dnech, na 3 pracovištích a pro 6 hodnotitelů, viz souhrn, který uvádí Tab. 20.

Tab. 20. Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro párové míry shod pro test VENTANA HER2 (4B5) Assay u karcinomu prsu s barvením na pozitivitu na HER2.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI
Mezi pracovišti	APA	8074/8420	95.9	(92.8, 98.6)
	ANA	8034/8380	95.9	(92.5, 98.7)
	OPA	8054/8400	95.9	(92.7, 98.6)
Mezi hodnotiteli	APA	402/421	95.5	(92.0, 98.6)
	ANA	400/419	95.5	(91.6, 98.6)
	OPA	401/420	95.5	(91.9, 98.6)
Mezi dny	APA	1634/1684	97.0	(95.0, 98.9)
	ANA	1626/1676	97.0	(94.8, 98.9)
	OPA	1630/1680	97.0	(95.0, 98.9)

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95% CI

Poznámka: Oboustranný 95% CI vypočtený metodou percentilový bootstrap s 2000 replikátů stratifikovanými podle koše kvalifikačního skóre případů.

Poznámka: Pro účely analýzy studie byly případy se skóre HER2 IHC 0 a 1+ seskupeny jako negativní případy a případy se skóre HER2 IHC 2+ a 3+ byly seskupeny jako pozitivní případy.

Funkční charakteristiky na přístroji BenchMark ULTRA s použitím detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit nebo **ultraView** Universal DAB Detection Kit Reprodukovatelnost barvení mezi laboratořemi a mezi jednotlivými dny na přístroji BenchMark ULTRA: Mezilaboratorní studie reprodukovatelnosti se zúčastnily tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech amerických. Sklíčka s řezy ze 48 případů invazivního karcinomu prsu FFPE [12 z každé kategorie HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] a 1 pár kontrolních sklíček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides na každý z 12 barvicích cyklů byly rozděleny na pracoviště, kde probíhala studie, pro barvení na přístroji BenchMark ULTRA s použitím doporučeného barvicího protokolu a detekční soupravy **ultraView** Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého případu obarvené reagencií negativní na Ig. Patologové, kteří neznali stav případu, vyhodnotili sklíčka a poskytli klinické hodnocení – skóre (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky byly analyzovány společností Ventana. Za použití standardní nomenklatury pro tabulky 2x2 byla průměrná pozitivní shoda (APA) napříč pracovišti vypočítána jako $2a / (2a + b + c)$ a průměrná negativní shoda (ANA) byla vypočtena jako $2d / (2d + b + c)$. Napříč všemi pracovišti byla APA mezi pracovišti na základě klinického hodnocení (pozitivní, negativní) 90.0 % (108/120) a ANA byla 92.9 % (156/168). U párového srovnání pracovišť byla APA vypočítána jako $a / (a + c)$ a ANA byla vypočtena jako $d / (b + d)$. Míra APA mezi pracovišti byla 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) a 89.5 % (34/38) pro pracoviště A vs. B, pracoviště A vs. C, respektive pracoviště B vs. C. Míra ANA mezi pracovišti byla 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) a 93.1 % (54/58) pro pracoviště A vs. B, pracoviště A vs. C, respektive pracoviště B vs. C.

Následující tabulky představují 3x3 prezentace výsledků pro jednotlivé hodnotitele na základě klinického hodnocení, kde byla oddělena skóre 2+ a 3+.

Tab. 21. Analýza 3x3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm A a pracovištěm B – klon 4B5, přístroj 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 (%) (95% CI) 43/48 (89.6) (77.8–95.5)				

Tab. 22. Analýza 3x3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm A a pracovištěm C – klon 4B5, přístroj BenchMark ULTRA s detekční soupravou **ultraView** Universal DAB Detection Kit.

Pracoviště A	Pracoviště C			
	3+	2+	0, 1+	Celkem
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Celkem	12	5	31	48
Celková procentuální shoda (OPA): n/N (%) (95% CI) 42/48 (87.5) (75.3–94.1)				

Tab. 23. Analýza 3×3 míry mezilaboratorní shody mezi pracovištěm B a pracovištěm C – klon 4B5, přístroj 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 (%) (95% CI) 44/48 (91.7) (80.4–96.7)				

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

Srovnávací studie pro přístroj BenchMark ULTRA a přístroj BenchMark XT

Studie srovnávání platform se zúčastnily dvě laboratoře provádějící barvení a tři pracoviště provádějící odečítání ve Spojených státech amerických. Sklíčka s řezy z 280 případů invazivního karcinomu prsu FFPE [přibližně 70 případů z každé kategorie HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] byla náhodně rozdělena na dvě pracoviště provádějící barvení (140 případů na každé pracoviště) pro barvení na přístroji BenchMark XT a přístroji BenchMark ULTRA s použitím příslušných doporučených barvicích protokolů a detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého případu obarvené reagenty negativní na Ig. Obarvené případy z pracoviště 1 a pracoviště 2 byly rozděleny do čtyř sad sklíček a poskytnuty, po jedné sadě, třem různým kvalifikovaným hodnotitelům (patologům), jednomu hodnotiteli na pracovišti 1, jednomu na pracovišti 2 a jednomu na pracovišti 3. Patologové, kteří neznali stav případů ani barvicí platformu, vyhodnotili všechny čtyři sady sklíček a pro jednotlivé případy poskytli klinické skóre (tj. 0, 1+, 2+, 3+). Výsledky byly analyzovány společností Ventana. Míry PPA (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou klonu 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě klinického hodnocení (pozitivní, negativní) byly 91.6 % (85.9) pro hodnotitele A, 91.2 % (85.3) pro hodnotitele B, respektive 94.9 % (89.3) pro hodnotitele C. Míry NPA (a spodní hranice oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou klonu 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě klinického hodnocení (pozitivní, negativní) byly 91.9 % (85.8) pro hodnotitele A, 93.8 % (88.3) pro hodnotitele B, respektive 99.3 % (96.3) pro hodnotitele C. Hodnota OPA pro barvení s klonem 4B5 s použitím přístroje BenchMark ULTRA oproti přístroji BenchMark XT na základě analýzy 2×2 klinického hodnocení (pozitivní, negativní) byla 91.8 % pro hodnotitele A, 92.5 % pro hodnotitele B, respektive 97.4 % pro hodnotitele C. Prezentace 3×3 mír shod mezi platformami pro jednotlivé hodnotitele na základě klinického skóre (0/1+, 2+, 3+) je uvedena v tabulkách níže:

Tab. 24. Míry shody mezi platformami, analýza 3×3, přístroj BenchMark ULTRA versus přístroj BenchMark XT – hodnotitel A.

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

Tab. 25. Míry shody mezi platformami, analýza 3×3, přístroj BenchMark ULTRA versus přístroj BenchMark XT – hodnotitel B.

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

Tab. 26. Míry shody mezi platformami, analýza 3×3, přístroj BenchMark ULTRA versus přístroj BenchMark XT – hodnotitel C.

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

Reprodukovatelnost mezi patologi pro vzorky ze studie srovnávání přístrojů

Pozitivní a negativní míra shody s oboustrannými 95 % intervaly spolehlivosti byly vypočteny pro šest možných párových srovnání mezi hodnotiteli pro každou platformu.

U přístroje BenchMark ULTRA byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) a 83.5 % (111/133) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) a 98.5 % (132/134) (v daném pořadí). Míra OPA byla nejvyšší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem B (91.8 %) a nižší mezi hodnotitelem B a hodnotitelem C (91.0 %) a hodnotitelem A a hodnotitelem C (88.8 %).

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

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

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

Tab. 27. Hodnotitel A, iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit – analýza 3×3 míry shody – barvení s klonem 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA.

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

Tab. 28. Hodnotitel B, iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit – analýza 3×3 míry shody – barvení s klonem 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA.

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

Tab. 29. Hodnotitel C, iVIEW DAB Detection Kit vs. ultraView Universal DAB Detection Kit – analýza 3×3 míry shody – barvení s klonem 4B5 na přístroji BenchMark ULTRA.

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

Reprodukovatelnost mezi patologi pro vzorky ze studie srovnávání metod detekce: Pozitivní a negativní míra shody s oboustrannými 95 % intervaly spolehlivosti byly vypočteny pro šest možných párových srovnání mezi hodnotiteli pro každou metodu.

U detekční soupravy iVIEW DAB Detection Kit byly míry PPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) a 79.7 % (55/69) (v daném pořadí). Míry NPA pro hodnotitele A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A a C vs. B byly 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) a 97.0 % (65/67) (v daném pořadí). Celková míra shody byla nejvyšší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem B (96.3 %) a nižší mezi hodnotitelem A a hodnotitelem C (86.0 %) a hodnotitelem B a hodnotitelem C (88.2 %).

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

Analytická výkonnost v případech žaludečních tkání

Studie preciznosti u přístroje BenchMark ULTRA a BenchMark XT:

Opakovatelnost mezi cykly na přístroji BenchMark XT byla provedena v pěti cyklech prováděných během 5denního období (dny nenásledovaly po sobě). U pěti sklíček obsahujících tři případy žaludeční tkáně se skóre 0, 1+, 2+ a 3+ exprese HER2 byla prokázána 100% shoda v rámci pozitivní/negativní hodnoty pro jednotlivé tkáně.

Opakovatelnost v rámci cyklu na přístroji BenchMark XT byla provedena na 28 sklíčkách obsahujících tři případy žaludeční tkáně se skóre 0, 1+, 2+ a 3+ exprese HER2. Všechny případy byly v rámci pozitivní/negativní hodnoty pro jednotlivé typy tkáně hodnoceny rovnocenně.

Opakovatelnost v rámci platformy byla provedena u tří přístrojů BenchMark XT. V těchto cyklech bylo všech 30 sklíček z každého ze dvou různých bloků několika tkání, obsahujících tři případy žaludeční tkáně se skóre 0, 1+, 2+ a 3+ exprese HER2, hodnoceno v rámci pozitivní/negativní hodnoty pro jednotlivé typy tkáně rovnocenně.

Opakovatelnost v rámci platformy byla testována u tří přístrojů BenchMark ULTRA. V těchto cyklech bylo všech 15 sklíček z jednoho bloku několika tkání hodnoceno v rámci pozitivní/negativní hodnoty pro jednotlivé typy tkáně rovnocenně.

Opakovatelnost mezi platformami byla testována na třech přístrojích BenchMark XT a třech přístrojích BenchMark ULTRA. V těchto cyklech bylo všech 30 sklíček z jednoho bloku několika tkání hodnoceno v rámci pozitivní/negativní hodnoty pro jednotlivé typy tkáně rovnocenně.

Srovnání detekčních souprav iVIEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit za použití případů žaludečních tkání

K provedení testování srovnání detekčních souprav byl použit klon 4B5. Tento klon byl testován na dvou přístrojích (přístroji BenchMark XT a přístroji BenchMark ULTRA) s použitím detekčních souprav iVIEW DAB Detection Kit a ultraView Universal DAB Detection Kit. V rámci testování bylo použito sto deset tkáňových případů. U obarvených sklíček bylo vyhodnoceno pozitivní/negativní klinické skóre.

Míry přijatelnosti morfologie i pozadí byly 100 % pro obě detekční soupravy i přístroje. Přímá srovnání pozitivního a negativního klinického posouzení mezi detekčními soupravami jsou pro jednotlivé přístroje uvedena v následujících tabulkách.

Tab. 30. Klinické posouzení pro detekční soupravu ultraView Universal DAB Detection Kit versus detekční souprava iVIEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT.

ultraView Universal DAB Detection Kit	iVIEW DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	21	0	21
Negativní	0	189	189
Celkem	21	189	210
	n/N	% (95% CI)	
Pozitivní procentuální shoda	21/21	100 (84.5–100)	
Negativní procentuální shoda	189/189	100 (98.0–100)	
Celková procentuální shoda	210/210	100 (98.2–100)	

Tab. 31. Srovnání klinického posouzení na přístrojích BenchMark XT a BenchMark ULTRA pomocí detekční soupravy ultraView Universal DAB Detection Kit.

Přístroj BenchMark XT s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit	Přístroj BenchMark ULTRA s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	20	1	21
Negativní	0	189	189
Celkem	20	190	210
	n/N	% (95% CI)	
Pozitivní procentuální shoda	20/20	100 (83.9–100)	
Negativní procentuální shoda	189/190	99.5 (97.1–99.9)	

Přístroj BenchMark XT s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	Přístroj BenchMark ULTRA s detekční soupravou <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Celková procentuální shoda	209/210	99.5 (97.4–99.9)	

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi pro klon 4B5 u karcinomu žaludku:

Studie byla provedena na třech pracovištích provádějících testování. Pro zařazení do studie byly vybrány vzorky na základě klinického IHC skóre pro klon 4B5, takže byl přibližně stejný počet pozitivních (3+) a negativních (0, 1+) případů. Dále byly studovány až čtyři případy způsobitých případů rakoviny žaludku kategorie 2+.

Všechna tři pracoviště používala přístroj BenchMark XT a přístroj BenchMark ULTRA k provedení čtyř barvicích cyklů na jeden přístroj. Případy byly pro barvení randomizovány pomocí postupu stratifikované randomizace, který přiřazoval případy tak, že každý cyklus obsahoval případy představující všechny kategorie hodnocení HER2 u rakoviny žaludku. Cykly na každém přístroji a na každém pracovišti zahrnovaly stejné případy. Na každém pracovišti bylo jedno sklíčko z každého případu obarveno s klonem 4B5 a další sklíčko ze stejného případu bylo obarveno reagentem CONFIRM Negative Control Rabbit Ig na přístroji BenchMark ULTRA. Druhý pár sklíček ze stejného případu byl na každém pracovišti podobným způsobem obarven na přístroji BenchMark XT. Sklíčka s případy byla hodnocena jedním kvalifikovaným hodnotitelem na každém pracovišti, který u žádného vzorku neznal dříve stanovená klinická IHC skóre.

Celková shoda pro všechny hodnotitelné případy byla 100 % u všech tří srovnání mezi pracovišti jak u přístroje BenchMark ULTRA, tak u přístroje BenchMark XT. Celková shoda mezi přístrojem BenchMark ULTRA a přístrojem BenchMark XT byla pro hodnotitelné případy 100 % na každém ze tří pracovišť. Míra přijatelnosti pozadí a míra přijatelnosti morfologie pro všechny případy byly pro oba přístroje na pracovištích A a C 100 % a na pracovišti B pro oba přístroje > 95 %. Viz tabulky níže.

Tab. 32. Celková shoda klinického posouzení mezi pracovišti: karcinom žaludku, všechny hodnotitelné případy.

Přístroj BenchMark ULTRA	Celková procentuální shoda (pozitivní a negativní případy)	Celková procentuální shoda (včetně nejednoznačných případů)
Pracoviště A versus pracoviště B: n/N (%) (95% CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	38/42 (90.5 %) (77.9–96.2)
Pracoviště C versus pracoviště C: n/N (%) (95% CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	35/42 (83.3 %) (69.4–91.7)
Pracoviště B versus pracoviště C: n/N (%) (95% CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	31/42 (73.8 %) (58.9–84.7)
Přístroj BenchMark XT	Celková procentuální shoda (pozitivní a negativní případy)	Celková procentuální shoda (včetně nejednoznačných případů)
Pracoviště A versus pracoviště B: n/N (%) (95% CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0–91.9)
Pracoviště C versus pracoviště C: n/N (%) (95% CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0–91.9)
Pracoviště B versus pracoviště C: n/N (%) (95% CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	35/43 (81.4 %) (67.4–90.3)

Tab. 33. Celková shoda klinického posouzení mezi platformami: karcinom žaludku, všechny hodnotitelné případy.

Přístroj BenchMark ULTRA versus přístroj BenchMark XT	Celková procentuální shoda (pozitivní a negativní případy)	Celková procentuální shoda (včetně nejednoznačných případů)
Pracoviště A: n/N (%) (95% CI)	40/40 (100 %) (91.2–100)	42/44 (95.5 %) (84.9–98.7)
Pracoviště B: n/N (%) (95% CI)	34/34 (100 %) (89.8–100)	37/42 (88.1 %) (75.0–94.8)
Pracoviště C: n/N (%) (95% CI)	32/32 (100 %) (89.3–100)	38/44 (86.4 %) (73.3–93.6)

Tab. 34. Míra přijatelnosti pozadí a míra přijatelnosti morfologie: karcinom žaludku, všechny případy.

Přístroj BenchMark ULTRA	Pracoviště A	Pracoviště B	Pracoviště C
Míry přijatelnosti morfologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Míry přijatelnosti pozadí	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
Přístroj BenchMark XT	Pracoviště A	Pracoviště B	Pracoviště C
Míry přijatelnosti morfologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Míry přijatelnosti pozadí	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

Srovnávací studie přístrojů BenchMark a BenchMark GX s přístrojem BenchMark XT: Karcinom žaludku

Sklíčka s fezy pro 3 TMA obsahující případy karcinomu žaludku FFPE [přibližně 50 případů na TMA] byla obarvena na přístroji BenchMark XT, přístroji BenchMark a přístroji BenchMark GX pomocí příslušných doporučených barvicích protokolů pro detekční soupravy *ultraView* Universal DAB Detection Kit a *iVIEW* DAB Detection Kit. Kontroly zahrnovaly kontrolní sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko každého TMA obarvené reagentem negativní na Ig. Obarvená sklíčka byla hodnocena jedním hodnotitelem (patologem).

Celkové míry shody (a spodní hranice oboustranných 95% intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou klonu 4B5 na základě klinického posouzení (pozitivní, negativní) byly 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 *iVIEW* DAB Detection Kit 96.6 % (92.7–98.4), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *iVIEW* DAB Detection Kit 95.9 % (91.8–98.0).

Míry pozitivní shody (a spodní hranice oboustranných 95% intervalů spolehlivosti) pro barvení s protilátkou klonu 4B5 na základě klinického posouzení (pozitivní, negativní) byly 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 *iVIEW* DAB Detection Kit 80.0 % (54.8–93.0), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *iVIEW* DAB Detection Kit 73.3 % (48.0–89.1).

Míry negativní shody (a spodní hranice oboustranných 95% intervalů spolehlivosti) pro barvení s klonem 4B5 na základě klinického posouzení (pozitivní, negativní) byly následující: Přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8–99.6), přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1–99.9), přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou *iVIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.6–99.4), přístroj BenchMark GX versus

přístroj BenchMark XT s detekční soupravou iVIEW DAB Detection Kit 98.1 % (94.5–99.3). Prezentace 2×2 mír shod pro jednotlivá srovnání na základě klinického posouzení (pozitivní, negativní) je uvedena v tabulkách níže.

Tab. 35. Míry shody mezi platformami, přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit, analýza 2×2: karcinom žaludku.

Klon 4B5 s detekční soupravou ultraView 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% CI)	
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)	

Tab. 36. Míry shody mezi platformami, přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou ultraView Universal DAB Detection Kit, analýza 2×2: karcinom žaludku.

Klon 4B5 s detekční soupravou ultraView 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% CI)	
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)	

Tab. 37. Míry shody mezi platformami, přístroj BenchMark versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou iVIEW DAB Detection Kit, analýza 2×2: karcinom žaludku.

Klon 4B5 s detekční soupravou iVIEW 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% CI)	
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)	

Tab. 38. Míry shody mezi platformami, přístroj BenchMark GX versus přístroj BenchMark XT s detekční soupravou iVIEW DAB Detection Kit, analýza 2×2: karcinom žaludku.

Klon 4B5 s detekční soupravou iVIEW 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% CI)	
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)	

KLINICKÁ VÝKONNOST

Rakovina prsu s nízkou úrovní exprese HER2

Studie klinických výsledků – DESTINY-BREAST04

DESTINY-BREAST04 byla multicentrická, randomizovaná, otevřená, aktivně kontrolovaná studie fáze III hodnotící bezpečnost a účinnost trastuzumabu deruxtekanu (ENHERTU®) u neresekovatelné a/nebo metastazující rakoviny prsu s nízkou úrovní exprese HER2.

Pro zařazení do studie musely nádory vykazovat nízké úrovně exprese HER2 stanovené pomocí IHC s protilátkou anti-HER2 (4B5).

Tumor s IHC skóre HER2 1+ byl považován za indikaci stavu nízké úrovně exprese HER2. Tumor byl také považován za tumor s nízkou úrovní exprese HER2, pokud bylo IHC skóre HER2 2+ a reflexní testování pomocí testu INFORM HER2 Dual ISH ukázalo nepřítomnost genové amplifikace HER2 (ISH-). Zařazení pacienti byli randomizováni v poměru 2 : 1 k léčbě trastuzumabem deruxtekanem (ENHERTU®) nebo k chemoterapii podle výběru lékaře. Centrálně získané skóre nízké úrovně exprese HER2 (IHC 1+ nebo IHC 2+ / ISH-) bylo jedním ze 3 stratifikačních faktorů použitých pro randomizaci pacientů v této studii.

Analýzy účinnosti byly provedeny u celého analytického souboru a u populace pozitivní na hormonálními receptory (pozitivní na estrogenový a/nebo progesteronový receptor).

V primární analýze bylo analyzováno posouzení přežití bez progresu (PFS) na základě zaslepeného nezávislého přezkumu (BICR) v podskupině pozitivní na hormonálními receptory se stratifikací podle centrálně hodnoceného stavu/skóre nízké úrovně exprese HER2 (IHC 1+ nebo IHC 2+ / ISH-), počtu předchozích linií chemoterapie (1 nebo 2) a předchozí léčby cyklin dependentními inhibitory (CDK)4/6 (ano, nebo ne). Léčba trastuzumabem deruxtekanem (ENHERTU®) byla v této populaci spojena se statisticky významným a klinicky významným prodloužením PFS i celkového přežití (OS) ve srovnání s léčbou dle volby lékaře.

Tab. 39. PFS a OS podle BIRC v populaci pozitivní na hormonálními receptory a v úplném analytickém souboru (DESTINY-BREAST04)

Parametr	Populace pozitivní na hormonální receptory		Úplný analytický soubor	
	Trastuzumab deruxtekan (ENHERTU®) N = 331	Léčba podle volby lékaře N = 163	Trastuzumab deruxtekan (ENHERTU®) N = 373	Léčba podle volby lékaře N = 184
Medián PFS a (95% CI)	10.1 (9.5, 11.5)	5.4 (4.4, 7.1)	9.9 (9.0, 11.3)	5.1 (4.2, 6.8)
Poměr rizik b (95% CI)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	
Hodnota p c	< 0.0001		< 0.0001	
Celkové přežití (OS)				

Parametr	Populace pozitivní na hormonální receptory		Úplný analytický soubor	
	Trastuzumab deruxtekan (ENHERTU®) N = 331	Léčba podle volby lékaře N = 163	Trastuzumab deruxtekan (ENHERTU®) N = 373	Léčba podle volby lékaře N = 184
Medián OS a (95% CI)	23.9 (20.8, 24.8)	17.5 (15.2, 22.4)	23.4 (20.0, 24.8)	16.8 (14.5, 20.0)
Poměr rizik b (95% CI)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
Hodnota p c	0.0028		0.0010	

CI = interval spolehlivosti; PFS = přežití bez progresu; OS = celkové přežití.

a Mediány PFS a OS jsou odhady z Kaplanovy-Meierovy analýzy. Oboustranné 95% intervaly CI pro medián PFS a OS byly vypočteny pomocí Brookmeyerovy-Crowleyho metody.

b Na základě stratifikovaného Coxova modelu proporcionálních rizik. Stratifikačními faktory byly skóre nízké úrovně exprese HER2, počet předchozích linií chemoterapie a buď předchozí léčba inhibitory cyklin dependentní kinázy 4/6 (pro celý soubor analýzy a pozitivní na hormonální receptor), nebo stav hormonálního receptoru / cyklin-dependentní kinázy (pro celý soubor analýzy).

c Oboustranná hodnota p na základě stratifikovaného log-rank testu.

Rakovina prsu s pozitivitou na HER2

Srovnávací studie králičí monoklonální protilátky klonu 4B5 a myší monoklonální protilátky PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody u rakoviny prsu

Byla provedena studie srovnání metod, která zkoumala korelaci mezi klonem 4B5 a protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (protiátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11)) a PathVysion HER2 FISH, což jsou dříve schválené diagnostické testy. Studie se zúčastnilo šest zkoušejících. Ve studii byly použity dvě nezávislé kohorty vzorků invazivního karcinomu prsu: jedna se 178 vzorky z Cleveland Clinic Foundation (kohorta 1) a druhá se 144 vzorky odebranými společnostmi IMPATH Predictive Oncology z několika mezinárodních pracovišť (kohorta 2). Dvě skupiny tří různých zkoušejících hodnotily dvě nezávislé kohorty (kohorta 1: n = 178, kohorta 2: n = 144) pomocí známých případů rakoviny prsu obarvených s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) a klonem 4B5. Údaje pro metodu FISH byly získány z anamnézy pacientů. Pro každý případ bylo vytvořeno konsenzuální skóre od tří hodnotitelů pro každou protilátku, aby se snížila variabilita u jednoho hodnotitele, o které je známo, že při hodnocení HER2 existuje.^{42,43,44} Celkem bylo vyhodnoceno 322 případů. Sklička obarvená s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) byla zpracována a obarvena podle pokynů výrobce uvedených v metodickém listu protilátky PATHWAY anti-HER2 (CB11). Mezi barvením a hodnocením skliček obarvených s protilátkou PATHWAY anti-HER2 (CB11) uběhl průměrně přibližně jeden rok. Níže jsou uvedeny klinicky významné výsledky (pozitivní/negativní) testu IHC pro HER2 (4B5) a IHC testu pro PATHWAY anti-HER2 (CB11) u obou kohort:

Tab. 40. Klinicky významná skóre: IHC testy pro kohortu 1

Protílátka HER2 (4B5)	Protílátka PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	86	5	91
Negativní	7	80	87
Celkem	93	85	178
	n/N	% (95% interval spolehlivosti)	
Pozitivní procentuální shoda	86/93	92.5 (85.2–96.9)	
Negativní procentuální shoda	80/85	94.1 (86.8–98.1)	
Celková procentuální shoda	166/178	93.3 (88.5–96.4)	

Protílátka HER2 (4B5)	Protílátka PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Klinicky významné výsledky byly považovány za IHC pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+).			

Tab. 41. Klinicky významná skóre: IHC testy pro kohortu 2

Protilátka HER2 (4B5)	Protilátka PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	69	22	91
Negativní	0	53	53
Celkem	69	75	144
	n/N	% (95% interval spolehlivosti)	
Pozitivní procentuální shoda	69/69	100 (97.5–100)	
Negativní procentuální shoda	53/75	70.6 (58.5–80.1)	
Celková procentuální shoda	122/144	84.7 (78.2–90.0)	
Klinicky významné výsledky byly považovány za IHC pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+).			

Výsledky založené na IHC a získané z IHC testu pro HER2 (4B5) byly také porovnány s výsledky získanými z testu PathVysion HER2 FISH. Pozitivní výsledky IHC odpovídají případům s IHC skóre 2+ nebo 3+ a pozitivní výsledky FISH odpovídají případům, které prokázaly amplifikaci genu HER2. Údaje o shodě pro IHC test klonu 4B5 ve srovnání s výsledky FISH u obou kohort jsou uvedeny níže:

Tab. 42. Klinicky významná shoda: IHC versus FISH pro kohortu 1

Protílátka HER2 (4B5)	n/N	% (95% interval spolehlivosti)
Pozitivní procentuální shoda	83/93	89.2 (82.5–95.1)
Negativní procentuální shoda	77/85	90.6 (84.0–96.4)
Celková procentuální shoda	160/178	90.0 (85.4–93.6)

Tab. 43. Klinicky významná shoda: IHC versus FISH pro kohortu 2

Protílátka HER2 (4B5)	n/N	% (95% interval spolehlivosti)
Pozitivní procentuální shoda	80/86	93.0 (87.9–96.3)
Negativní procentuální shoda	47/58	81.0 (73.4–86.0)
Celková procentuální shoda	127/144	88.2 (82.1–92.2)

Závěr: Tato studie prokázala, že existuje klinicky významná shoda (celková shoda mezi pozitivními/negativními výsledky) mezi testem s klonem 4B5 a testem PATHWAY anti-HER2 (CB11), čímž se prokazuje, že test VENTANA HER2 (4B5) Assay je přijatelnou alternativou k testu PATHWAY anti-HER2 (CB11) pro použití jako pomůcka při hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u nichž se uvažuje o léčbě trastuzumabem (Herceptin). Tato studie také prokázala, že výsledky exprese HER2 získané z IHC testu s klonem 4B5 jsou srovnatelné s výsledky stavu genu HER2 stanovenými analýzou FISH.

Srovnání se zařazovacím testem u studií PERJETA (pertuzumab) a KADCYLA (trastuzumab emtansin) v případech karcinomu prsu

Shoda k testům pro zařazení do kohort ze studií PERJETA a KADCYLA byla stanovena barvením hodnocených vzorků s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay. Celkem 2753 vzorků hodnocených pro studii PERJETA a 99 vzorků hodnocených pro studii KADCYLA bylo obarveno s testem VENTANA HER2 (4B5) Assay. Byly stanoveny míry

shod (PPA, NPA a OPA). 95% CI (oboustranný 95 % interval spolehlivosti) byl vypočítán metodou skóre.

Tab. 44. Shoda testu s klonem 4B5 a testu Dako u stavu HER2 pro všechny subjekty hodnotitelné pro HER2. Subjekty, které lze hodnotit pomocí IHC, mají stav HER2 jako pozitivní nebo negativní stanovený jak testem s klonem 4B5, tak zařazovacím IHC testem.

Studie	Skóre získané testem s klonem 4B5 ^b	Stav 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 n/N (%) (95% CI)	2380/2558 (93.0) (92.0–94.0)		
	Negativní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	257/272 (94.5) (91.1–96.6)		
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2637/2830 (93.2) (92.2–94.1)		

^a Pozitivní = IHC pozitivní a/nebo ISH amplifikováno. Negativní = IHC negativní a ISH není amplifikováno nebo ISH není amplifikováno a není IHC pozitivní.

^b IHC: Pozitivní = 3+; negativní = 0, 1+ nebo 2+.

Tab. 45. Shoda testu s klonem 4B5 a testu Dako u stavu IHC pro všechny subjekty hodnotitelné pomocí IHC. Subjekty, které lze hodnotit pomocí IHC, mají stav HER2 jako pozitivní nebo negativní stanovený jak testem s klonem 4B5, tak zařazovacím IHC testem.

Studie	Stav stanovený testem s klonem 4B5 ^a	Stav stanovený testem Dako HercepTest ^a		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
PERJETA a KADCYLA	Pozitivní	2330	65	2395
	Negativní	21	414	435
	Celkem	2351	479	2830
	Pozitivní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2330/2351 (99.1) (98.6–99.4)		
	Negativní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	414/479 (86.4) (83.1–89.2)		
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2744/2830 (97.0) (96.3–97.5)		
PERJETA	Pozitivní	2267	63	2330
	Negativní	10	399	409
	Celkem	2277	462	2739

		Stav stanovený testem Dako HercepTest ^a		
Studie	Stav stanovený testem s klonem 4B5 ^a	Pozitivní	Negativní	Celkem
	Pozitivní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2267/2277 (99.6) (99.2–99.8)		
	Negativní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	399/462 (86.4) (82.9–89.2)		
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2666/2739 (97.3) (96.7–97.9)		
KADCYLA	Pozitivní	63	2	65
	Negativní	11	15	26
	Celkem	74	17	91
	Pozitivní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	63/74 (85.1) (75.3–91.5)		
	Negativní procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	15/17 (88.2) (65.7–96.7)		
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	78/91 (85.7) (77.1–91.5)		

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

Tab. 46. Shoda testu s klonem 4B5 a testu Dako u IHC skóre pro všechny subjekty hodnotitelné pomocí IHC. Subjekty, které lze hodnotit pomocí IHC, mají stav HER2 jako pozitivní nebo negativní stanovený jak testem s klonem 4B5, tak zařazovacím IHC testem.

Studie	Skóre získané testem s klonem 4B5	Skóre získané testem Dako HercepTest			
		3+	2+	0/1+	Celkem
PERJETA a KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Celkem	2351	325	154	2830
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2703/2830 (95.5) (94.7–96.2)			
PERJETA	3+	2267	62	1	2330
	2+	9	226	13	248
	0/1+	1	24	136	161
	Celkem	2277	312	150	2739

		Skóre získané testem Dako HercepTest			
Studie	Skóre získané testem s klonem 4B5	3+	2+	0/1+	Celkem
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	2629/2739 (96.0) (95.2–96.7)			
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Celkem	74	13	4	91
	Celková procentuální shoda n/N (%) (95% CI)	74/91 (81.3) (72.1–88.0)			

Tab. 47. Přijatelnost barvení u testu s klonem 4B5. Subjekty testované pomocí IHC. IHC barvení je považováno za přijatelné, pokud lze určit platné IHC skóre (0, 1+, 2+ nebo 3+). Mezi důvody nepřijatelného 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% CI)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Počet opakovaných IHC testů	40	0	40
Konečná přijatelnost barvení n/N (%) (95% CI)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

Studie klinických výsledků – KATHERINE

Výkonnost testu s klonem 4B5 pro HER2 a koktejlui INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (testu INFORM HER2 Dual ISH) byla zkoumána ve studii KATHERINE (BO27938), randomizované, multicentrické, otevřené studii fáze III, za účelem vyhodnocení účinnosti a bezpečnosti trastuzumab emtansinu (KADCYLA) oproti trastuzumabu (Herceptin) coby adjuvantní léčbě u pacientů s primární rakovinou prsu pozitivní na HER2, kteří mají po předoperační léčbě reziduální tumor patologicky přítomný v prsu nebo axilárních lymfatických uzlinách (NCT01772472).

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

Do studie KATHERINE bylo zařazeno 1486 pacientů s rakovinou prsu v časném stádiu, pozitivní na HER2, s reziduálním invazivním nádorem v prsu a/nebo axilárních lymfatických uzlinách po léčbě založené na taxanu a trastuzumabu jako součást neoadjuvantní léčby před zařazením do studie. Pacienti obdrželi radioterapii a/nebo

hormonální terapii souběžně se zkoumanou léčbou podle místních pokynů. Pro prokázání nadměrné exprese HER2 definované jako IHC 3+ nebo amplifikační poměr ISH ≥ 2.0 , stanovené v centrální laboratoři, byly vyžadovány vzorky nádoru prsu. Pacienti byli pro podávání trastuzumabu nebo přípravku KADCYLA randomizováni (1 : 1). Randomizace byla stratifikována podle klinického stadia při prezentaci, stavu hormonálních receptorů, předoperační léčby zaměřené na HER2 (trastuzumab, trastuzumab plus další látky směřované na HER2) a patologického stavu uzliny hodnocené po předoperační léčbě.

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

Klinicky významné a statisticky významné zlepšení v IDFS bylo pozorováno u pacientů, jejichž vzorky z rakoviny prsu byly identifikovány jako pozitivní na HER2 s IHC testem s klonem (4B5) a kteří dostávali trastuzumab emtansin (KADCYLA), ve srovnání s trastuzumabem (Herceptin) (HR = 0.43, 95% CI [0.32, 0.58]), což odpovídá 57% snížení rizika události IDFS. Výsledky účinnosti pro IHC pozitivní podskupinu jsou uvedeny v Tab. 48.

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

Tab. 48. Výsledky účinnosti ze studie KATHERINE pro IHC pozitivní podskupinu.

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

^a Data z první průběžné analýzy

^b 3letá míra bez události odvozená z Kaplanových-Meierových odhadů

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

Karcinom žaludku

Srovnání testu s klonem 4B5 a testu HercepTest pro rakovinu žaludku u lidí
Byla provedena zaslepená externí studie, která porovnávala výkonost barvení klonu 4B5 na přístroji BenchMark XT s výkonem testu Dako HercepTest. Byly studovány dvě kohorty vzorků, (1) nově vytvořená tkáňová mikropole (TMA) obsahující 248 případů rakoviny žaludku (u šesti případů bylo později zjištěno, že jsou duplikáty a byly odstraněny) a (2) podmnožina 183 klinických vzorků z klinického hodnocení Trastuzumab pro rakovinu žaludku (Trastuzumab for Gastric Cancer, ToGA), která zkoumala stav HER2 a klinický výsledek u pacientů léčených přípravkem Herceptin (trastuzumab). Laboratoř obarvila případy pomocí klonu 4B5 a testu HercepTest. Oběma testy bylo obarveno celkem 431 případů a (po odstranění duplicitních případů) bylo do srovnání zahrnuto 398 jedinečných případů. Patolog vyhodnotil případy na stupnici 0/1+, 2+ a 3+. Pozitivní případy sestávají ze skóre 2+ a 3+, zatímco negativní případy jsou 0 a 1+. Míry shod mezi testem s klonem 4B5 a testem HercepTest pro obě studované kohorty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 49. Údaje o shodě pro test s klonem 4B5 (IHC) versus HercepTest u karcinomu žaludku.

Zdroj tkáně	Celková procentuální shoda (95% CI)	Pozitivní procentuální shoda (95% CI)	Negativní procentuální shoda (95% CI)
TMA ^a a ToGA ^b	91.0 (87.7–93.4)	82.1 (70.2–90.0)	92.4 (89.1–94.8)

Zdroj tkáně	Celková procentuální shoda (95% CI)	Pozitivní procentuální shoda (95% CI)	Negativní procentuální shoda (95% CI)
n	362/398	46/56	316/342

Výsledky IHC byly považovány za pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+) na protilátky.

^a TMA: vzorky tkáňových mikročipů

^b ToGA: vzorky z klinických hodnocení ze studie ToGA

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Pokud pozitivní kontrola vykazuje slabší zabarvení, než se očekávalo, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagensů.
- Pokud je pozitivní kontrola negativní, je třeba ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má sklíčko správný štítek s čárovým kódem. Pokud je sklíčko správně označeno, je třeba zkontrolovat cyklus ostatních pozitivních kontrol na stejném přístroji, abyste zjistili, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo jednou z běžných sekundárních reagensů. Tkáň mohly být nesprávně odebrány, fixovány nebo odparafinovány. Při odběru, skladování a fixaci je třeba dodržovat správný postup.
- Pokud nebyl odstraněn veškerý parafín, může se stát, že k barvení nedojde. Postup odparafinování je třeba zopakovat.
- Pokud se tkáňové řezy ze sklíčka vymývají, je třeba sklíčka zkontrolovat a zajistit, aby byla kladně nabitá.
- Pokud je na normální sliznici v těsné blízkosti oblasti nádoru u karcinomu žaludku přítomno jaderné a cytoplazmatické zabarvení, jež může vést k záměně při interpretaci barvení membrány, lze případ testovat pomocí ISH.
- Nápravná opatření najdete v uživatelské příručce přístroje v části Postup barvení, případně se obraťte na 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.
- Schrohl AS, Pedersen HC, Jensen SS, Nielsen SL, Brünner N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) immunoreactivity: specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. *Histopathology*. 2011;59(5):975-983.
- Jay JL, Brunhoeber PS, Smith MH, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). *Histopathology*. 2013;62(4):563-577.
- Moasser MM. The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of HER2, EGFR, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
- Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, et al. HER2-low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J Clin Oncol*. 2020;38:1951-1962.
- Osborne CK, Shou J, Massarweh S, et al. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res* 11:865s-870s, 2005.
- Eiger D, Agostinetto E, Saude-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021;13.
- Zhang H, Katerji H, Turner BM, Hicks DG. HER2-low Breast Cancers. *Am J Clin Pathol*. 2021.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697.

- Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2019;90(1):44-54.
- Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
- Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):476-484.
- The Global Cancer Observatory: Cancer Today (GLOBOCAN) 2020. International
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:1364-1382.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.
- Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
- von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-628.
- Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):461-71.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- Modi S, Park H, Murthy RK, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2020;38:1887-1896.
- Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer [published online ahead of print, 2022 Jun 5]. *N Engl J Med*. 2022;10.1056/NEJMoa2203690.
- Cislo M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, et al. Distinct Molecular Subtypes of Gastric Cancer: From Lauren to Molecular Pathology. *Oncotarget*. 2018;9(27):19427-19442.
- Carson FL, Cappellano C. *Histotechnology; A Self-Instructional Text*, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 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. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
- 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.
- Hoffmann M, et al. *Histopathology*. 2008;52:797-805.
- Rüschhoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics

- in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
38. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
 39. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
 40. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
 41. Ahn S, Woo JW, Lee K, et al. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. J Pathol Trans Med. 2020;54:34-44.
 42. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent *in situ* hybridization, Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
 43. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
 44. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

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

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

Symbody

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: další informace naleznete na internetových stránkách elabdoc.roche.com/symbols).



Globální číslo obchodní položky

Rx only

Pro USA: Upozornění: Federální zákony omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku.

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
C	Aktualizace oddílu Postup barvení a části Konvence při hodnocení pro karcinom žaludku v tabulce 7. Opravy terminologie a interpunkce. Doplněn přístroj BenchMark ULTRA PLUS.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY a ULTRAVIEW jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní názvy produktů a ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÍ ÚDAJE



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

www.roche.com



0123