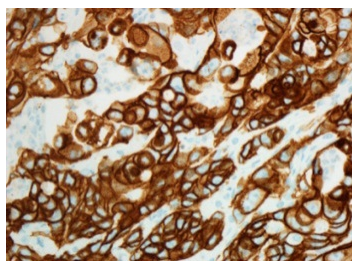


VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493

05999570001

IVD  50



1. ábra: VENTANA anti-HER2/neu (4B5) 3+ festődés gyomorkarcinómában

kivizsgálásának segítésére ajánlott, akiknél megfontolás alatt áll a Herceptin kezelés és olyan emlőrákos betegeknél, akiknél megfontolás alatt áll a Kadcyla (trastuzumab-emtansine) vagy Perjeta (pertuzumab) kezelése.

A termékkel kapott eredményt patológus szakorvosnak kell kiértékelnie a szövettani vizsgálat, a vonatkozó klinikai adatok és megfelelő kontrollok figyelembevételével.

Ez az antitest *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szolgál.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARÁZAT

A VENTANA HER2 (4B5) egy nyúl monoklonális antitest (4B5 klón), amely a cerbB2 onkoprotein (HER2) belső doménje ellen irányul. A cerbB2 onkoproteint Akiyama et al klónozták és írta le 1986-ban.¹ Ez egy körülbelül 185 kD méretű transzmembrán glikoprotein, amely szerkezetileg hasonló az epidermális növekedési faktor receptorra (EGFR). A protein számos növekedésfaktor-receptorhoz, valamint a src család transforming proteinjeihez hasonló tirozin kináz aktivitással jellemezhető. A kódoló szekvencia megfelel egy extracelluláris binding doménnek és egy intracelluláris kináz doménnek. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a HER2 részt vesz a jelátvitelben és a mitogén aktivitás stimulálásában.¹

Vizsgálatok szerint Western blotolással a 4B5 klón reagál az SKBR3 sejtlizátumból származó 185 kD méretű fehérjével. Az SKBR3 egy olyan emlőkarcinóma sejtvonal, amely 128-szoros mértékben overexpresszálja a HER2 mRNA-t.² Az azonosított sáv mérete jól megfelel a HER2 protein jelentett méretének (185 kD).¹ Transzfektált sejtvonalakon (HEK293) végzett immunhisztokémiai kísérletek azt mutatták, hogy a 4B5 klón megfesti a HER2-vel transzfektált sejteket és a HER4-gyel transzfektált sejteket. HER1-gyel vagy HER3-mal transzfektált sejteken nem volt megfigyelhető festődés. A rekombináns HER4 fehérjével végzett Western blot vizsgálatok adatai azt is jelzik, hogy a 4B5 klón felismeri a HER4 epitópot.

Emlőkarcinómában a HER2 protein olyan szinten expresszálódik, ami a különféle adenokarcinómák akár 20%-ában kimutatható immunhisztokémiai módszerrel.

Az invazív ductalis karcinómák 15–30%-a HER2-pozitív.³ Az emlő Paget-kórjának gyakorlatilag valamennyi esete⁴ és a comedo típusú ductalis karcinóma *in situ* eseteinek akár 90%-a pozitív.³ Gyomorkarcinómában a HER2 protein olyan szinten expresszálódik, amely immunhisztokémiai úton detektálható az intesztinális típusú gyomorrákok akár 30%-ában, a kevert típusú gyomorrákok 15%-ában és a diffúz típusú gyomorrákok 5%-ban. A HER2 protein overexpressziójának immunhisztokémiai detektálását továbbá segítségképpen használják annak meghatározására, hogy mely betegeknél javallott a HER2-re célzott terápia.^{5,31-35}

A Ventana normál szövetek, neoplasztikus szövetek és 322 emlőkarcinóma eset 4B5 klón-vel végzett festődésének eredményét vizsgálta meg. A vizsgált normál szövetekben az expresszió megfelelt a megjelent irodalomban közlötnek a tekintetben, hogy nem volt váratlan specifikus citoplazma/membrán festődés, kivéve az alábbi esetekben: két mandulát érintő esetben, ahol az epitheliális membrán festődött, egy mellékpajzsmirigy esetben és egy nyelöcső-epitheliomát érintő esetben. A vizsgált neoplasztikus szövetek esetében a citoplazma/membrán festődés emlő-, vastagbél- és petefészek-daganat esetében volt

látható. Háromszázhuszonkettő (322) emlőkarcinóma esetet vizsgáltak meg a 4B5 klón-vel egy módszer-összehasonlító vizsgálatában a PATHWAY HER2/neu (CB11)-gyel. A két teszt között szignifikáns korrelációt tapasztaltak a festődést illetően. További információk a Várható eredmények összegzése c. részben találhatók. A 4B5 klón-re vonatkozó további információk az Irodalomjegyzékben találhatók.²⁴⁻³⁰

Az előhígított VENTANA HER2 (4B5) és a használatra kész *VIEW DAB Detection Kit* és *ultraView Universal DAB Detection Kit*, VENTANA automata IHC/ISH tárgylemezfestővel együtt használva csökkenti az emberi eredetű hiba lehetőségét, valamint az egyedi reagenshígításból, a kézi pipettázásból és a reagensek kézi felviteléből adódó változékonyságot.

KLINIKAI JELENTŐSÉG

Az emlőrák a leggyakrabban előforduló carcinóma nőkben, és a második vezető oka a rák okozta halálozásnak. Észak-Amerikában egy a nyolchoz annak az esélye, hogy egy nőnél emlőrák alakul ki.⁶ A korai felismerés és a megfelelő terápia jelentős mértékben javíthatja a teljes túlélési arányt.⁷ A gyomorrák világviszonylatban a negyedik leggyakoribb rákbetegség, és a második leggyakoribb oka a rákbetegség okozta halálozásnak. A gyomorrák leggyakoribb kezelése a sebészeti beavatkozás. A legtöbb gyomorrák esetében azonban előrehaladott stádiumban ismerik fel, és a sebészeti műtét gyakran bonyolult. Az előrehaladott gyomorrák kezelésére kemoterápiát alkalmaznak, annak ellenére, hogy a rákbetegek túlélési aránya nagyon alacsony. A rutin immunhisztokémiában (IHC) egyszerűen használható kisméretű szövetminták, és ezt a technikát a karcinóma értelmezéséhez fontos antigéneket kimutató antitestekkel együtt alkalmazva a patológus hatékony eszközökhöz jut a betegség diagnosztizálásához és prognosztizálásához. Az emlő- és a gyomorrák egyik fontos markere manapság a cerbB2 onkoprotein (HER2).

A HER2 egy transzmembrán protein.⁸ Szoros kapcsolatban áll az EGFR-rel és csakúgy, mint az EGFR, tirozin kináz aktivitással rendelkezik.¹ Számos daganatfajtaiban, beleértve az emlőrákakat és gyomorkarcinómákat, kimutatták a génamplifikációt és az ennek megfelelő cerbB2 overexpressziót.^{8,9}

A HER2-re célzott terápiaik jótékony hatásának bizonyult egyes emlő- és gyomorkarcinómában szenvedő betegek esetében. Kizárólag a HER2-pozitív emlő- és gyomorkarcinómában szenvedő betegeknél van jótékony hatása a HER2-re célzott kezelésnek. Emlő- és gyomorkarcinómákban a HER2-státuszt meghatározó *in vitro* diagnosztika fontos segítséget nyújt a kezelőorvosnak azon betegek meghatározásában, akiknél a HER2-re célzott terápia javallott.

A HER2 bármely detektálórendszerével kapott eredmények értékelése során figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a HER2 emlő- és gyomortumorkban és egészséges szövetekben is expresszálódik, bár más mértékben és már expressziós mintával.¹⁰ A szövettani minták rendelkeznek az ép szöveti morfológia előnyeivel, amely segíti a minta HER2 pozitívitásának megítélését.

AZ ELJÁRÁS ELVE

VENTANA HER2 (4B5) nyúl monoklonális antitest, amely a paraffinba ágyazott szöveti metszetekben található HER2 proteinhez kötődik. A specifikus antitest kétféleképpen lokalizálható: egyrészt biotinnal konjugált másodlagos antitestek segítségével, melyek felismerik a nyúl immunoglobulinokat, majd sztreptavidin torna-peroxidáz (HRP) konjugátum (*VIEW DAB Detection Kit*), vagy szekunder antitest-HRP konjugátum (*ultraView Universal DAB Detection Kit*) hozzáadásával. Ezt követően a specifikus antitest-enzim komplex láthatóvá tehető egy csapadékat képző enzimek reakció-termékkel. Mindegyik lépést inkubálni kell pontos ideig és hőmérsékleten. A VENTANA automata IHC/ISH tárgylemezfestő berendezés minden inkubálási lépés végén leöblíti a metszeteket a reakció leállítása és azoknak a nem kötött anyagoknak az eltávolítása érdekében, amelyek a következő lépés során gátolhatnak a kívánt reakciókat. Ezenkívül folyékony fedőanyagot is alkalmaz, ami minimalizálja a vizes reagensek elpárolgását a tárgylemezről.

A klinikai eseteket a megfelelő kontrollok teljesítményének ismeretében kell értékelni. A Ventana azt javasolja, a betegmintával megegyező módon pozitív szöveti kontrollt (például gyengén pozitív emlő- vagy gyomorkarcinóma) is fixáljanak és dolgozzanak fel. A VENTANA HER2 (4B5)-vel való festés mellett egy másik lemez fessen meg CONFIRM Negative Control Rabbit Ig-vel. Az érvényesnek tekintett tesztek esetében a pozitív kontrollnak mutatnia kell a tumorsejt membránfestődését. Ezeknek az elemeknek negatívnak kell lennie, ha a festést CONFIRM Negative Control Rabbit Ig antitesttel végzik. Ezenkívül javasolt még negatív szövetet tartalmazó kontrollmetszetet (például HER2-negatív emlő- vagy gyomorkarcinóma) is hozzáadni a VENTANA automata IHC/ISH tárgylemezfestő segítségével feldolgozott és futtatott minden egyes mintatételhez. A negatív szöveti kontrollt VENTANA HER2 (4B5)-vel kell festeni, biztosítva, hogy az antigénerősítő és más előkezelő eljárások nem hoztak létre hamis pozitív festést.

BIZTOSÍTOTT REAGENSEK

VENTANA HER2 (4B5) az adagoló 50 vizsgálathoz elegendő reagenst tartalmaz.

Egy 5 ml-es adagoló VENTANA HER2 (4B5) körülbelül 30 µg, humán cerbB2 antigén elleni, nyúl eredetű monoklonális antitestet tartalmaz.

Az antitestet 0,01 M EDTA-t, 0,05%-Brij-35-öt, 0,3% hordozófehérjét és 0,05% nátrium-azid tartósítószerrel tartalmazó 0,05 M TRIS pufferes sóoldattal kell meghígítani.

Nyomokban foetalis borjú szérum van jelen a törzsolddal, körülbelül 0,25%.

A reagens teljes fehérjekoncentrációja körülbelül 16 mg/ml. A specifikus antitest-koncentráció körülbelül 6 µg/ml. A VENTANA HER2 (4B5) szövettenyészeti szupernatánsokból hígított nyúl IgG.

A részletes leírást lásd a VENTANA detektálókészlet tájékoztatójában: (1) Az eljárás elve, (2) A szükséges, de nem mellékelt anyagok és reagens, (3) Mintavétel és a minta analízishez történő előkészítése, (4) Minőségellenőrzési eljárások, (5) Hibaelhárítás, (6) Az eredmények értelmezése és (7) Általános korlátozások.

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

Az antitesthez nincsenek mellékelve a festéshez szükséges reagens, pl. a VENTANA detektáló készletek és a kiegészítő eszközök, a negatív és pozitív szövetkontrollhoz alkalmazott metszeteket is ideértve.

Előfordulhat, hogy a tájékoztatón felsorolt egyes termékek bizonyos helyeken nem kaphatók. Érdeklődjön a helyi terméktámogatási képviselőnél.

TÁROLÁS

2–8 °C-on tárolandó. Fagyasztani tilos!

A reagens megfelelő felviteléhez és az antitest stabilitásának biztosításához a kupakot vissza kell helyezni minden egyes futtatás után, és az adagolót azonnal függőleges helyzetbe állítva vissza kell tenni a hűtőszekrénybe.

Minden antitest-adagolón fel van tüntetve a lejárati dátuma. Megfelelő tárolás mellett a reagens a címken feltüntetett időpontig stabil. Ne használja a reagenst a lejárati időn túl.

A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

Ez a primer antitest rutinszerűen feldolgozott, formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szöveteken alkalmazható, VENTANA detektálókészletek és VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT és BenchMark ULTRA, automata tárgylemezfestő berendezések használata esetén. Az ajánlott fixálószer 10%-os, semlegesre puffertelt formalin.²

Megközelítően 4 µm vastagságú metszeteket kell készíteni, és üveg tárgylemezre felvinni. Használjon Superfrost Plus lemezeket, vagy ennek megfelelőt. A Ventana által végzett tanulmányok azt mutatják, hogy a 2–8 °C-on tárolt, levegőn szárított szöveti és sejtvonalmetszetek legalább 6 hónapig stabilak. Mindegyik laboratóriumnak validálnia kell a metszetek stabilitását a saját eljárásainak és környezeti tárolási körülményeinek megfelelően.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. *In vitro* diagnosztikai (IVD) használatra.
2. Ennek a terméknek a Kadcyly vagy Perjeta kezelésekre alkalmas betegek kiválasztásához való használata nem minden földrajzi helyen lehetséges. Kérjük, forduljon helyi Roche képviselőjéhez, aki megerősíti az adott helyen való elérhetőséget.
3. A reagens szemmel vagy nyálkahártyákkal történő érintkezését el kell kerülni. Ha a reagens érzékeny területtel kerül érintkezésbe, bő vízzel öblítse le.
4. Az emberi vagy állati eredetű anyagokat biológiailag veszélyes anyagnak kell kezelni, és a megfelelő óvintézkedéseket betartva kell megsemmisíteni.
5. Kerülje a reagens mikrobiális szennyeződését, mert téves eredményeket kaphat.
6. Az utasításoknak megfelelő használat esetén a termék besorolás szerint nem veszélyes anyag. A reagensben található tartósítószer a nátrium-azid. A túlzott nátrium-azid expozíció bőr- és szemirritációt okoz, valamint a nyálkahártyák és a felső légutak irritációját eredményezheti. A nátrium-azid koncentrációja 0,05% ebben a termékben, és nem éri el az OSHA veszélyes anyagra vonatkozó kritériumait. A NaN₃ az ólom- és rézcsövekkel reakcióba léphet, és potenciálisan robbanékony fém-azidokat hozhat létre. A kiöntése során öblítse le nagy mennyiségű vízzel, ezzel megakadályozva az azidfelhalmozódást a csövezetekben.¹² Szisztémás allergiás reakció alakulhat ki az arra érzékeny egyéneknél.
7. A hulladékok javasolt ártalmatlanítási módszerével kapcsolatban forduljon a helyi vagy az állami hatóságokhoz.
8. További információkért lásd a termék biztonsági adatlapját.

FESTÉSI ELJÁRÁS

A VENTANA primer antitesteket VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT és BenchMark ULTRA automata tárgylemezfestő berendezésen, VENTANA detektáló készletekkel és kiegészítővel együtt történő használatra fejlesztették ki. Az ajánlott festési protokollokat az 1. táblázat: és a 2. táblázat: mutatja be.

Ezt az antitestet pontosan meghatározott időn át végzett inkubációs időkre optimalizálták, de a felhasználónak személyesen kell validálnia a szóban forgó reagenssel kapott eredményeket.

Az automata eljárások paraméterei a készülék Kezelési útmutatójában leírt módon megjeleníthetők, kinyomtathatók és szerkeszthetők. Az immunhisztokémiai festési eljárásokkal kapcsolatban további részleteket talál a megfelelő VENTANA detektálókészlet tájékoztatójában.

1. táblázat: Ajánlott festési protokoll a VENTANA HER2 (4B5) reagenshez *VIEW DAB* Detection Kit készlettel a BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT berendezéseken és a BenchMark ULTRA berendezésen.

Eljárás típusa	Módszer		
	BenchMark és BenchMark GX berendezés	BenchMark XT berendezés	BenchMark ULTRA berendezés
Deparaffinálás	Kiválasztott	Kiválasztott	Kiválasztott
Sejtkondicionálás (antigénfeltárás)	Cell Conditioning 1, Szabványos	Cell Conditioning 1, Szabványos	ULTRA CC1, enyhe
Antitest (primer)	32 perc, 37 °C	32 perc, 37 °C	24 perc, 36 °C
A/B Blokk (Biotin blokkolás)	Nincs kiválasztva	Kiválasztott	Kiválasztott
Kontrasztfesték (hematoxilin)	Hematoxylin II, 4 perc	Hematoxylin II, 4 perc	Hematoxylin II, 4 perc
Kontrasztfestés után	Bluing, 4 perc	Bluing, 4 perc	Bluing, 4 perc

2. táblázat: Ajánlott festési protokoll VENTANA HER2 (4B5) reagenshez *ultraView DAB* detektálókészlettel berendezésen, BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT berendezésen és BenchMark ULTRA berendezésen.

Eljárás típusa	Módszer	
	BenchMark, BenchMark GX és BenchMark XT berendezés	BenchMark ULTRA berendezés
Deparaffinálás	Kiválasztott	Kiválasztott
Sejtkondicionálás (antigénfeltárás)	Cell Conditioning 1, enyhe	ULTRA CC1, enyhe
Antitest (primer)	16 perc, 37 °C	12 perc, 36 °C
ultraMosás	Kiválasztott	Kiválasztott
Kontrasztfestés	Hematoxylin II, 4 perc	Hematoxylin II, 4 perc
Kontrasztfestés után	Bluing, 4 perc	Bluing, 4 perc

MINŐSÉG-ELLENŐRZÉSI ELJÁRÁSOK

Sejtvonal rendszerkontrollok

A Ventana külön termékként értékesít négy formalinnal fixált, paraffinba ágyazott sejtvonal kontrollt, metszetben, egyetlen töltött tárgylemezen elhelyezve. A PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (katalógusszám 781-2991) hasznosnak bizonyulhatnak a VENTANA HER2 (4B5)-vel végzett festés feldolgozási módszerének előzetes validálásához. A négy sejtvonalkontrollt a génkópia számára vonatkozó *in situ* hibridizáció jellemzi. Megfelelően feldolgozva és festve, a sejtvonalak festődése a 4. táblázatban leírtak szerint kell, hogy történjen. Amennyiben a jelzett festés nem egyértelmű a megfelelő magokban, főleg az 1+ és 2+ kontrollok esetében, akkor a szövetek festését meg kell ismételni.

3. táblázat: A PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides tulajdonságai

HER2 IHC pontszám	Sejtvonal	HER2/Chr17 arány*
0	MDA-MB-231	1,11
1+	T47D	1,12
2+	MDA-MB-453	2,66
3+	BT-474	5,53

* A HER2/Chr17 arány három eltérő gyártási számú PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides átlaga, fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével mérve.

Pozitív szövetkontroll

A betegmintához hasonló módon fixált és feldolgozott pozitív kontrollszövetet minden egyes tesztfeltétel és minden elvégzett VENTANA HER2 (4B5) festési eljárás szerint futtatni kell. Az alkalmazott szövet pozitív festődésű sejt-/szövetkomponenseket és negatív sejt-/szövetkomponenseket is tartalmazhat, és pozitív és negatív kontrollszövetként is szolgálhat. A kontrollszövetnek friss boncolási/biopsziás/sebészeti mintának kell lennie, és a lehető leghamarabb elő kell készíteni és fixálni kell azokat a vizsgálati metszetre jellemző módon. Az ilyen szövetekkel az elemzés minden lépése ellenőrizhető, a szövet előkészítésétől a festésig. A vizsgálati mintáktól eltérően rögzített vagy feldolgozott szövetek használhatók az összes reagens és módszer lépéseinek kontrolljaként, kivéve a rögzítést és a szövet előkészítést. Az optimális minőség-ellenőrzéshez és a reagensbomlás enyhe jeleinek kimutatására a gyengén pozitív festődésű szövet megfelelőbb, mint az erősen pozitív festődésű. Azt a szövetet ideális választani, amelyik ismertén gyengén pozitív festést ad, biztosítva a rendszer érzékenységét a reagens kismértékű lebomlására vagy az IHC módszerrel kapcsolatos problémákra. Általánosságban azonban a HER2-pozitív neoplasztikus szövet a pathologia természete (overexpresszió) miatt erősen pozitív. A HER2 (4B5) pozitív kontroll egy példája az ismert gyengén HER2-pozitív invazív emlőkarcinóma vagy a gyengén pozitív gyomorkarcinóma minta. A pozitívan festődő szövetösszetevőket (neoplasztikus sejtek membránfestődése) használjuk annak megerősítésére, hogy hozzáadtuk az antitestet, és a berendezés megfelelően működött.

Az ismert pozitív szövetkontrollok csak a feldolgozott szövetek és vizsgálati reagensok megfelelő teljesítményének ellenőrzésére használhatók, a páciensminták specifikus diagnózisainak meghatározására nem.

Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontrollként alkalmazott metszet (ductalis vagy lobularis invazív emlőkarcinóma vagy gyomorkarcinóma) negatív szövetkontrollként is alkalmazható. A nem festődő összetevőknek (körülvevő stróma, lymphoid sejtek és véredények) a specifikus festődés hiányát kell mutatniuk, és a primer antitest okozta specifikus háttérfestődés (álpozitív) mértékéig kell szolgálniuk. Használjon a betegmintákkal azonos módon fixált, feldolgozott és beágyazott, ismert negatív szövetet.

Negatív reagenskontroll

Az eredmények értelmezéséhez minden minta mellett egy negatív reagenskontrollt is futtatni kell. A negatív reagenskontrollokat a primer antitest helyett használják a nem specifikus festés értékelésére. A metszetet a CONFIRM Negative Control Rabbit Ig alkalmazásával kell megfesteni. A negatív reagenskontroll inkubációs ideje egyezzen meg a primer antitest inkubációs idejével.

Nem magyarázható eltérések

A kontrollok meg nem magyarázható eltéréseiről haladéktalanul tájékoztatni kell a helyi képviselőt. Ha a minőség-ellenőrzés eredményei nem felelnek meg a specifikációknak, a beteg eredményei érvénytelenek. Lásd a kiadvány Hibaelhárítás című részét. Azonosítsa és orvosolja a problémát, majd ismételve meg a páciens mintáinak vizsgálatát.

A módszer ellenőrzése

Egy antitest vagy festési rendszer diagnosztikai eljárásban történő első használata előtt az antitest specifitását vizsgálattal kell ellenőrizni egy olyan szövetsorozaton, amely ismert pozitív vagy negatív szöveteket reprezentál, ismert immunhisztokémiai teljesítményjellemzőkkel rendelkezik (lásd a termékismertető e fejezetében korábban leírt Minőség-ellenőrzési eljárások részt, valamint a College of American Pathologists

Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist¹³ Minőség-ellenőrzési ajánlásait, vagy a CLSI Approved Guideline¹⁴ című dokumentumát, vagy mindkettőt). Ezeket a minőség-ellenőrzési eljárásokat mindegyik új antitesttel esetében meg kell ismételni, vagy amikor a vizsgálati paramétereket módosítják. Az ismert HER2-státuszú emlő- és gyomorrákszövetek alkalmasak a teszt igazolására.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A VENTANA automata immunfestési eljárás barna színű (DAB) reakciótermék kicsapódását okozza a VENTANA HER2 (4B5) antitest által lokalizált antigéntartalmú helyeken. Az eredmények értelmezése előtt az immunhisztokémiai eljárásokban jártas, képzett patológusnak kell a kontrollokat értékelnie és a festett terméket minősíteni.

Pozitív kontrollok

Először a festett pozitív szövetkontrollt kell megvizsgálni annak igazolására, hogy minden reagens megfelelően működik-e. A megfelelően elszíneződött reakciótermék megjelenése a célsejtek membránján belül a pozitív reaktivitást jelzi. Az inkubáció hosszától és a használt hematoxin koncentrációjától függően az utánfestés a sejtmagok halvány-sötétkék színeződését eredményezi. A túlzott vagy nem teljes kontrasztfestés veszélyeztetheti az eredmények helyes értelmezését.

Ha a pozitív szövetkontrollok nem mutatnak pozitív festődést, a vizsgálati minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív szövetkontrollok

A negatív szövetkontrollt a pozitív szövetkontroll után kell vizsgálni a cél antigénnek a primer antisszel való specifikus jelölődését megerősítendő. A negatív szövet kontrollban a speciális festés hiánya megerősíti az antitesteknek a sejtekkel vagy a sejtkomponensekkel való keresztreaktivitásának hiányát. Ha a negatív szövetkontrollban specifikus festődés jelentkezik, a páciensminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontrollok

Ha nem specifikus festődés fordul elő, annak diffúz megjelenése van. A kötőszövetek helyenkénti világos festése is megfigyelhető a formalinban túlzottan fixált szövetek metszeteiben. A festési eredmények értékeléséhez ép sejteket kell használni, mivel a nekrotikus vagy degenerált sejtek gyakran mutatnak nem specifikus festődést.

A páciensszövet

A beteg mintáit kell legutoljára vizsgálni. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagens-kontroll háttérfestődésének fényében kell értékelni. Mint bármely immunhisztokémiai vizsgálat esetében, a negatív eredmény azt jelenti, hogy a kérdéses antigén nem mutatható ki, nem pedig azt, hogy az antigén nincs jelen a vizsgált sejtekben vagy szövetekben. Az egyes szövetminták morfológiáját is vizsgálni kell hematoxin-eozinnal festett metszeteket alkalmazva, bármilyen immunhisztokémiai eredmény értelmezése esetén. A beteg morfológiái eredményeit és a vonatkozó klinikai adatokat szakképzett patológusnak kell értékelnie.

A FESTÖDÉS ÉRTELMEZÉSE

Pontozási konvenciók a VENTANA HER2 (4B5) értelmezéséhez emlőkarcinómában

A HER2 protein overexpresszióra pozitívnak tekintett emlőkarcinómáknak meg kell felelniük a festődési intenzitásra (2+ vagy annál magasabb a 0-tól 3+ -ig terjedő skálán) és a tumorsejtek százalékára (10% fölött) vonatkozó kritériumoknak. A festésnek a sejtmembránra kell lokalizálnia. Citoplazmatikus festés is jelen lehet, de ez a festődés nem számít bele a pozitívítás meghatározásába. Vizsgálja meg a teljes metszetet annak érdekében, hogy kizárólag jó állapotú és jól festett területeket értékeljen. A citoplazmatikus membránt körkörös körbevevő festődést lehet értékelni intenzitás szerint „2+” vagy „3+” pontszámúnak. A membrán részleges festődésének pontszáma „1+”. Előfordulhat, hogy az 1+ és a 2+ intenzitások megkülönböztetéséhez a kérdéses eseteket 40X vagy annál magasabb nagyításon kell megvizsgálni. A 3+ intenzitásúnak pontozott esetekkel szemben, a 2+ eredmény esetében a gyűrű élesebb és tisztábban körvonalazódik, míg a 3+ pontszámot elérő esetek egy nagyon vastag körvonallal látszódnak. Alább található egy gyors referenciátáblázat a festődési kritériumokkal. Lásd az Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma útmutatót (a Ventana értelmezési útmutatóját) a VENTANA HER2 (4B5) segítségével végzett festés részletesebb leírásával és fényképekkel.

4. táblázat: A sejtmembránfestődés intenzitásának és mintázatának kritériumai emlőkarcinómában alkalmazott VENTANA HER2 (4B5) esetében.

Festődési minta	Pontszám (a kezelőorvosnak jelentendő)	HER2-festődés megítélése
Nem figyelhető meg membránfestődés	0	Negatív
Halvány, részleges membránfestődés a daganatos sejtek bármely részén	1+	Negatív
Gyenge, teljes membránfestődés a daganatos sejtek több mint 10%-ánál	2+	Megbízhatatlan*
Erőteljes, teljes membránfestődés a daganatos sejtek több mint 10%-ánál	3+	Pozitív

*Reflex ISH javasolt

Pontozási konvenciók a VENTANA HER2 (4B5) értelmezéséhez
gyomorkarcinómában

A HER2 protein overexpresszióra pozitívnak tekintett nyomorkarcinómáknak meg kell felelniük a festődési intenzitásra és a membránfestés mintázatára (2+ vagy annál magasabb a 0-tól 3+-ig terjedő skálán), valamint a pozitív tumorsejtek százalékára vonatkozó kritériumoknak. A festődésnek a membránon kell megjelenie, de nem kell a teljes körfogatot lefednie, mivel gyakran megfigyelhető bazolaterális festődés, és azt a pontozásnál figyelembe kell venni. Citoplazmatikus és/vagy nukleáris festődés jelen lehet, de nem számít a pozitívítás kritériumai közé. Gyomorkarcinóma esetében a pozitív tumorsejtek százaléka attól függ, hogy a minta biopsziából (≥ 5 összefüggő sejt) vagy reszekciós mintából származik-e (≥ 10%).

Amikor felállítják a HER2 immunhisztokémiai vizsgálat pontozási irányvonalait nyomorrákhoz¹⁵, figyelembe kell venni, hogy, bár az erős membránfestődés a neoplasztikus sejtekben történő HER2 protein overexpresszió bizonyítéka, a festődésnek nem kell magában foglalnia a teljes körfogatot.

Rüschoff et al nukleáris festődéssel kísért vagy nem kísért diffúz citoplazmatikus festődésről számolt be nyomorrákban.¹⁶ Gyomorrák esetében kizárólag a membránfestődést kell figyelembe venni a HER2 protein expresszió meghatározásához.

A 4B5 klón antitesttel végzett immunhisztokémiai festés a gyomor nyálkahártya, és ritkábban gyomorrák és vagy gyomor/nyelőcső-karcinómában a neoplasztikus sejtek esetében citoplazmatikus és nukleáris festődést eredményezhet. A citoplazmatikus és a nukleáris festődés természete jelenleg nem ismert. A festődési mintázat nem tévesztendő össze a különálló membránfestődéssel, mivel az neoplasztikus sejtek esetében a HER2-pozitívást jelzi.

Lásd az Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma útmutatót (a Ventana értelmezési útmutatóját) a VENTANA HER2 (4B5) segítségével végzett festés részletesebb leírásával és mikrofotókkal.

5. táblázat: A sejtmembránfestődés intenzitásának és eloszlásának kritériumai nyomorkarcinómában alkalmazott VENTANA HER2 (4B5) esetében.

Festődési mintázat – reszekciós minta	Festődési mintázat – biopsziás minta	Pontszám (a vizsgálatot kérő kezelőorvosnak jelentendő)	HER2- festődés megítélése
Nincs reaktivitás <u>vagy</u> membránreaktivitás a tumorsejtek <10%- ában	Nincs reaktivitás vagy membránreaktivitás bármely tumorsejtben	0	Negatív
Halvány/alig érzékelhető membránreaktivitás a tumorsejtek ≥10%- ában; a sejtek reaktivitása a membrán egyes részeire korlátozódik	Tumorsejtcsoport* halvány/alig érzékelhető membránreaktivitással, függetlenül a festődött tumorsejtek százalékától	1+	Negatív
Gyenge vagy mérsékelten teljes, bazolaterális vagy laterális membránreaktivitás a tumorsejtek ≥ 10%-ában	Tumorsejtcsoport gyenge vagy mérsékelten teljes, bazolaterális vagy laterális membránreaktivitással, függetlenül a festődött tumorsejtek százalékától	2+	Megbíz- hatatlan**
Erős teljes, bazolaterális vagy laterális membránreaktivitás a tumorsejtek ≥ 10%-ában	Tumorsejtcsoport erős teljes, bazolaterális vagy laterális membránreaktivitással, függetlenül a festődött tumorsejtek százalékától	3+	Pozitív

*≥ 5 összefüggő sejt

** Reflex ISH javasolt

KORLÁTOZÁSOK

Általános korlátozások

- Az immunhisztokémia egy többlépcsős diagnosztikai folyamat, mely speciális képzést igényel a megfelelő reagensek és szövetmetszetek kiválasztása, a fixálás, a feldolgozás, az immunhisztokémiai tárgylemezek előkészítése és a festési eredmények értelmezése terén.
- A szövet festődése függ a festés előtti kezeléstől és a feldolgozástól. A nem megfelelő fixálás, fagyasztás, kiolvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszés vagy egyéb szövetekkel vagy folyadékokkal történő szennyezés műtermékeket, az antitest csapdába esését vagy álnegatív eredményeket okozhat. Inkonzisztens eredmények a fixálási és beágyazási módszerek eltéréseiből vagy a szöveten belüli jellemzők szabálytalanságaiból adódhatnak.
- A túlzott vagy nem teljes kontrasztfestés veszélyeztetheti az eredmények helyes értelmezését.
- Bármilyen pozitív festődésnek vagy annak hiányának klinikai interpretációját a klinikai kórtörténet, a morfológia és egyéb hisztopatológiai kritériumok ismeretében kell elvégezni. Bármilyen festődés vagy annak a hiányának klinikai értelmezését ki kell egészíteni morfológiai tanulmányokkal és megfelelő kontrollokkal, illetve egyéb diagnosztikai vizsgálatokkal. A patológus szakorvos felelőssége, hogy ismerje a festett preparátumok értelmezéséhez használt antitesteket, reagenseket és módszereket. A festést tanúsítvánnyal rendelkező laboratóriumban, patológus felügyelete mellett kell elvégezni, aki felel a festett lemezek ellenőrzéséért, és biztosítja a pozitív és negatív kontrollok megfelelőségét.

- A Ventana által biztosított antitestek és reagensek optimális hígításúak a felhasználáshoz, amennyiben a felhasználó betartja a mellékelt utasításokat. A javasolt vizsgálati eljárástól való bármilyen eltérés érvénytelenné teheti a várt eredményeket. Megfelelő kontrollokat kell alkalmazni, és ezt dokumentálni kell. Ha a felhasználó eltér a javasolt vizsgálati eljárásoktól, akkor köteles vállalni a felelősséget a páciens eredményeinek interpretációjáért.
- A termék használata nem javasolt áramlásos citometriában, mivel a teljesítményjellemzőket nem határozták meg.
- Korábban nem vizsgált szövetekben a reagensek nem várt reakciókat mutathatnak. A nem várt reakciók lehetősége még a vizsgált szövetcsoportokban sem zárható ki teljesen a neoplazmákban vagy egyéb patológiás szövetekben expresszáldó antigének biológiai változatossága miatt.¹⁷ Vegye fel a kapcsolatot a helyi ügyfélszolgálati képviselővel a dokumentált nem várt reakciókkal kapcsolatban.
- A hepatitisz B vírussal fertőzött és hepatitisz B felületi antigént (HBsAg) hordozó személyek szövetei nem specifikus festődést mutathatnak torna-peroxidázzal.¹⁸
- Egyes fehérjék vagy szubsztát reakciótermékek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények fordulhatnak elő. Álpozitív eredményeket a használt immunfestés típusától függően okozhat még pszeudoperoxidáz-aktivitás (vörösvértestek), endogén peroxidázaktivitás (citokrom C) vagy endogén biotin is (például: máj, agy, emlő, vese).¹⁹
- Mint bármely immunhisztokémiai vizsgálat esetében, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem mutatható ki, és nem azt, hogy az antigén nincs jelen a vizsgált sejtekben vagy szövetekben.

SPECIFIKUS KORLÁTOZÁSOK

- Az antitest optimalizálása az 1. és 2. táblázatban foglaltak szerint történt a VENTANA platformok és a detektálásra szolgáló reakciókat illetően. A szövetfixálás és -feldolgozás különbözősége miatt szükség lehet a primer antitest inkubációs idejének növelésére vagy csökkentésére az egyéni mintákban. A fixálás változóival kapcsolatos további információkat illetően lásd: „Immunohistochemistry Principles and Advances”.²⁰
- Az antitest a VENTANA detektálókészlettel és annak tartozékaival együtt olyan antigént detektál, amely túlélte a formalinfixálást, a szövetfeldolgozást és a metszetkészítést. A javasolt vizsgálati eljárásoktól eltérő felhasználók felelősek az eredmények értelmezéséért és validálásáért.
- A csontvelő specificitását nem tesztelték. A felhasználónak meg kell határoznia a megfelelő festést a fenti szövetek esetében, mielőtt értékelné a festődési információt.
- A 4B5 klón-tel végzett immunhisztokémiai festés a gyomornyálkahártya, és ritkábban gyomorrák és gyomor/nyelőcső-karcinómában a neoplasztikus sejtek esetében citoplazmatikus és nukleáris festődést eredményezhet. A citoplazmatikus és a nukleáris festődés természete jelenleg nem ismert. Ez a festődési mintázat nem tévesztendő össze a különálló membránfestődéssel, mivel az a neoplasztikus sejtek esetében a HER2-pozitivitást jelzi.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

A VENTANA HER2 (4B5) antitest teljesítményét specificitás, reprodukálhatóság és módszer-összehasonlítás szempontjából vizsgálták. Eltérő megjegyzés hiányában a festéseket a fent felsorolt IVIEW DAB Detection Kit protokoll alkalmazásával Benchmark XT automata tárgylemezfestőn végezték. Elsőként az emlőkarcinómára, másodikként a gyomorkarcinómákra vonatkozó adatokat írjuk le.

- Specificitás: A 4B5 klón specifikusságát meghatározó vizsgálat a legtöbb normál szövet esetében nem mutatott specifikus membránfestődést. A festési eredmények az alábbiak voltak: mellékvese (0/3), emlő (0/3), kisagy (0/3), agy (0/3), méhnyak (0/3), vastagbél (0/3), nyelőcső (1/3), szív (0/2), vese (0/3), máj (0/3), tüdő (0/3), mesothelialis sejtek (0/3), petefészek (0/3), hasnyálmirigy (0/3), mellékpajzsmirigy (1/3, fokális membránfestődés), perifériás ideg (1/3), agyalapi mirigy (0/2), prosztata (1/3), nyálamirigy (0/3), vázizom (0/3), bőr (0/3), vékonybél (0/3), lép (0/3), gyomor (0/3), here (0/3), csecsemőmirigy (0/2), pajzsmirigy (0/3), mandula (2/3 fokális festődés a felszíni epithelialis sejteken) és méh (0/3).

A 4B5 klón specifikusságát meghatározó egyik további vizsgálat a legtöbb neoplasztikus szövet esetében nem mutatott specifikus membránfestődést. A festési eredmények az alábbiak voltak: emlődaganat (1/4), carcinoid (0/2), vastagbél-daganat (1/3), hepatocelluláris tumor (0/5), leiomyoma (0/2), tüdő-daganat (0/2), lymphoma (0/3), melanoma (0/2), petefészek-daganat (1/2), hasnyálmirigy daganat (0/3), prosztata daganat (0/3), vesesejtes carcinoma (0/5), sarcoma (0/2), gyomor daganat (0/3), pajzsmirigy daganat (0/3) és nem meghatározott daganat (0/1).

A mandula epitheliumban, a nyelőcső epitheliumban, a prosztatában, a perifériás idegben, a mellékpajzsmirigyben, az emlőrákban, a vastagbélben és a petefészekrákban talált pozitív festődés megfelel a HER2-expressziót leíró megjelent szakirodalomnak.

- Érzékenység: Az érzékenységet a 9. és a 11. táblázat mutatja: Három patológus IHC-konszenzus pontszámai 4B5 klón esetében, a FISH-hez hasonlítva.
- A Benchmark és a Benchmark XT festőberendezés-rendszereken végzett festések futtatások közötti reprodukálhatóságának meghatározásához 0, 1+, 2+ és 3+ HER2-expressziót mutató öt emlőrák szövet három-három metszetének festését végeztük el. Minden esetben három lemezből 3 megfelelően festődött egy futtatáson belül és valamennyi vizsgált készülékplatform esetében. A felhasználónak ellenőriznie kell a futtatások alatti reprodukálhatóság eredményeit alacsony, közepes és magas antigéndenzitású néhány sorozatmetszet egyetlen ciklus alatt történő festésével.
- A Benchmark és a Benchmark XT festőberendezés-rendszerekhez tartozó három különböző berendezésen végzett festések futtatások és berendezések közötti reprodukálhatóságának meghatározásához 0, 1+, 2+ és 3+ pontszámú HER2-expressziót mutató öt emlőrák szövet három-három metszetének festését végeztük el. Minden esetben három lemezből 9 megfelelően festődött a három berendezésen keresztüli futtatások során, és valamennyi vizsgált készülékplatform esetében.
- A Benchmark XT berendezés laboratóriumok közötti festésének és értékelők közötti pontozásának reprodukálhatósága: A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság vizsgálatában három laboratórium vett részt. 40 semleges puffertelt formalinnal fixált invazív emlőkarcinóma eset metszeit [10-10 eset az egyes HER2 beosztási kategóriákban (0-1+, 2+, 3+)] és hat (6) PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t küldtünk valamennyi laboratóriumnak a VENTANA Benchmark XT automatizált tárgylemezfestő rendszeren történő festéshez a javasolt festési protokoll használatával. A kontroll céljára PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t és az esetek negatív Ig reagenssel festett második lemezét használták. Egyetlen helyszínen sem tapasztaltak érvénytelen futtatást a kontrollok teljesítménye alapján. Az eredményeket a Ventana elemezte. A negyvenből harmincnégy (34/40) lemez mutatott hasonló festési intenzitást a különböző festési helyszíneken. Hat minta (6/40 vagy 15%) különbözött maximum 1 intenzitásszinttel. Három (3/6) minta a 0 és az 1+ értékbe tért el egymástól, amelyek mindkét esetben negatívnak tekinthetők. Két minta (2/40 vagy 5%) a 2+ és 3+ értékben tért el egymástól, és egy minta (1/40) az 1+ és 2+ értékben tért el.
- A Benchmark XT értékelők közötti pontozásának reprodukálhatósága: Mind a 40 esetben (100%) a 3 patológusból legalább 2 egyetértett.
- A tételek közötti reprodukálhatóságot 3 különböző HER2 (4B5) tétel, és 0, 1+, 2+ és 3+ pontszámú HER2-expressziót mutató 5 emlőrák-szövet automata festésével határoztuk meg. A festett szöveteket három szakképzett értékelő a 0-3+ skálán pontozta. 100%-os egyezés volt a tételek és az értékelők között a 3 lemez és 5 megfestett szövet esetében.
- A 4B5 klón nyúl monoklonális antitest és a PATHWAY HER-2/neu (CB11) klón egér monoklonális antitest összehasonlító vizsgálatai: Az elvégzett vizsgálatok összefoglalója. Módszer-összehasonlító vizsgálatot végeztünk a 4B5 klón és a PATHWAY HER-2/neu (CB11) és a PathVysion Her-2 FISH antitestek között; a két utóbbit korábban diagnosztikai tesztek céljára engedélyezte az FDA. Hat kutató vett részt a vizsgálatban. Három különböző kutató két csoportban értékelt két független kohortot (1. kohort: n=178, 2. kohort: n = 144) PATHWAY HER-2/neu (CB11) és 4B5 klón antitestekkel megfestett, ismert emlőrákos esetek alkalmazásával. A beteganamnézis alapján határozták meg a FISH adatokat. Konszenzusos pontszámot számítottunk ki az egyes antitestekhez beosztott három értékelő pontszámaiból minden egyes esetben, a HER2-pontozás esetében ismeretes értékelők közötti variabilitás csökkentésére.^{21,22,23} Összesen 322 esetet értékeltünk. A PATHWAY HER-2/neu (CB11)-gyel festett lemezeket feldolgozták és a PATHWAY HER-2/neu (CB11) terméksimertetőjében közölt gyártói utasítások szerint megfestették. Átlagosan egy év telt el a festések és a PATHWAY HER-2/neu (CB11) antisszel festett lemezek leolvasása között. Mivel a hat értékelőből egy értékelő pontszámai a konfidencia-intervallumon (CI) kívül estek, a két kohort adatait az alább látható módon közöljük:

Az összehasonlító vizsgálatok mintáinak patológusok közötti reprodukálhatósága

6. táblázat: 1. kohort: Három patológus konszenzusos IHC pontszámai.

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

1. kohort: A 3 x 3 prezentáció teljesítményjellemzői.

Az összes egyezés $29 + 13 + 53/143 = 66,4\%$ (95% KI. = 38,6%, 59,7%).

1. kohort: A 2 x 2 prezentáció teljesítményjellemzői (a HER-2 antitest pozitív (2+ és 3+) és a negatív (0+ és 1+) pontszámok összesítve).

· A pozitív százalékos egyezés $29+24+13/31+37 = 100\%$ (95% KI. = 97,5% - 100%).

· A negatív százalékos egyezés $53/75 = 70,7\%$ (95% KI. = 58,5% - 80,1%).

Az összes egyezés $29+24+2+13+53/143 = 84,7\%$ (95% KI. = 78,2% - 90,0%).

7. táblázat: 2. kohort: Három patológus konszenzusos IHC pontszámai.

4B5 klón pontszám	PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszám			
	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Összesen	73	20	85	178

2. kohort: A 3 x 3 prezentáció teljesítményjellemzői.

Az összes egyezés $72 + 12 + 80/178 = 92,1\%$ (95% KI. = 80,1%, 93,1%).

2. kohort: A 2 x 2 prezentáció teljesítményjellemzői (HER2 antitestre pozitív (2+ és 3+) és negatív (0+ és 1+) pontszámok összeadva).

· A pozitív százalékos egyezés $72 + 12 + 1 + 1/73 + 20 = 92,5\%$ (95% KI. = 85,2% - 96,9%).

· A negatív százalékos egyezés $80/85 = 94,1\%$ (95% KI. = 86,8% - 98,1%).

Az összes egyezés $72 + 12 + 1 + 1 + 80/178 = 93,3\%$ (95% KI. = 88,5% - 96,4%).

8. táblázat: 1. kohort: Három patológus konszenzusos PATHWAY HER-2/neu (CB11) IHC pontszáma a FISH-hez viszonyítva.

PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszám	FISH eredmény		
	Pozitív	Negatív	Összesen
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Összesen	86	58	144

1. kohort: A PATHWAY HER-2/NEU (CB11) és FISH teljesítményjellemzői, 2 x 2 prezentáció (ahol a 2 és a 3 pontszámot pozitívnak tekintik)

· A pozitív százalékos egyezés $32 + 32/86 = 74,4\%$ (95% KI. = 63,8% - 83,2%).

· A negatív százalékos egyezés $53/58 = 91,4\%$ (95% KI. = 80,9% - 97,1%).

Az összes egyezés $32 + 32 + 53/144 = 81,2\%$ (95% KI. = 73,9% - 87,2%).

9. táblázat: 1. kohort: Három patológus IHC-konszenzus pontszámai 4B5 klón esetében, a FISH-hez hasonlítva.

4B5 klón pontszám	FISH eredmény		
	Pozitív	Negatív	Összesen
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Összesen	86	58	144

1. kohort: A 4B5 klón és a FISH teljesítményjellemzői, 2 x 2 prezentáció (ahol a 2 és a 3 pontszámot pozitívnak tekintik)

· A pozitív százalékos egyezés $55 + 25/86 = 93,0\%$ (95% KI. = 87,9% - 96,3%).

· A negatív százalékos egyezés $47/58 = 81,0\%$ (95% KI. = 73,4% - 86,0%).

Az összes egyezés $55 + 25 + 47/144 = 88,2\%$ (95% KI. = 82,1% - 92,2%).

10. táblázat: 2. kohort: Három patológus konszenzusos PATHWAY HER-2/neu (CB11) IHC pontszáma a FISH-hez viszonyítva.

PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszám	FISH eredmény		
	Pozitív	Negatív	Összesen
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Összesen	93	85	178

2. kohort: A PATHWAY HER-2/neu (CB11) és FISH teljesítményjellemzői, 2 x 2 prezentáció (ahol a 2 és a 3 pontszámot pozitívnak tekintik)

· A pozitív százalékos egyezés $72 + 13/93 = 91,3\%$ (95% KI. = 85,0% - 96,7%).

· A negatív százalékos egyezés $77/85 = 90,6\%$ (95% KI. = 83,9% - 96,3%).

Az összes egyezés $72 + 13 + 77/178 = 91,0\%$ (95% KI. = 86,5% - 94,9%).

11. táblázat: 2. kohort: Három patológus IHC-konszenzus pontszámai 4B5 klón esetében, a FISH-hez hasonlítva.

4B5 klón pontszám	FISH eredmény		
	Pozitív	Negatív	Összesen
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Összesen	93	85	178

2. kohort: A 4B5 klón és a FISH teljesítményjellemzői, 2 x 2 prezentáció (ahol a 2 és a 3 pontszámot pozitívnak tekintik)

· A pozitív százalékos egyezés $72 + 11/93 = 89,2\%$ (95% KI. = 82,5% - 95,1%).

· A negatív százalékos egyezés $77/85 = 90,6\%$ (95% KI. = 84,0% - 96,4%).

Az összes egyezés $72 + 11 + 77/178 = 90,0\%$ (95% KI. = 85,4% - 93,6%).

Az összehasonlító vizsgálatok mintáinak patológusok közötti reprodukálhatósága
Mivel közismerten a különböző patológusok eltérően értékelhetik az immunhisztokémiai lemezeket, három patológus olvasta le valamennyi mintát kohortonként (összesen 6 patológus). A „kettőből három” szabály alapján dönt el a végső eredmény. Alább található az egyes kohortokhoz tartozó összehasonlító vizsgálati mintának a három patológus által értékelt különböző eredményei.

12. táblázat: 1. kohort: 4B5 klón pontszámok három patológus esetében.

HER2 pontszám	4B5 klón pontszám		
	1. kutató	2. kutató	3. kutató
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Összesen	174	178	178

Megjegyzés: Összesen 3 minta különbözött több mint egy osztálybeli szinttel (pl. 0, 2+) a három patológus értékelése során.

1. minta: Az egyik patológus pontszáma 2+ volt, két patológus 0+ pontszámot ítelt.

2. minta: Egy patológus 0+ pontszámot, két patológus 2+ pontszámot adott.

3. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 1+ -nek, a harmadik pedig 2+ -nek értékelte.

13. táblázat: 1. kohort: Három patológus PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszámai

HER2 pontszám	PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszám		
	1. kutató	2. kutató	3. kutató
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Összesen	174	178	178

Megjegyzés: Összesen 1 minta tért el több mint egy osztálynyi szinttel (pl. 1 - 3+) a három patológus értékelése során.

1. minta: Az egyik patológus pontszáma 1+ volt, a második patológusé 2+, a harmadiké 3+.

14. táblázat: 2. kohort: 4B5 klón pontszámok három patológus esetében.

HER2 pontszám	4B5 klón pontszám		
	4. kutató	5. kutató	6. kutató
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Összesen	141	144	144

Megjegyzés: Összesen 6 minta különbözött több mint egy osztálybeli szinttel (azaz 0, 3+) a három patológus értékelése során.

1. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 0+ -nak, a harmadik pedig 2+ -nek értékelte.

2. minta: Az első patológus 1+ -nek, a második 1+ -nek, a harmadik pedig 3+ -nak értékelte.

3. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 2+ -nek, a harmadik patológus pedig 2+ -nek értékelte.

4. és 5. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 2+ -nek, a harmadik pedig 2+ -nek értékelte.

6. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 3+ -nak, a harmadik pedig 3+ -nak értékelte.

15. táblázat: 2. kohort: Három patológus PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszámai

HER2 pontszám	PATHWAY HER-2/neu (CB11) pontszám		
	4. kutató	5. kutató	6. kutató
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Összesen	144	144	144

Megjegyzés: Összesen 8 minta tért el több mint egy osztálynyi szinttel (pl. 0 - 2+) a három patológus értékelése során.

1-6. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 1+ -nek, a harmadik pedig 2+ -nek értékelte.

7. és 8. minta: Az első patológus 0+ -nak, a második 2+ -nek, a harmadik pedig 2+ -nek értékelte.

Alább található egy táblázat a patológuspárok százalékos egyezésének tartományáról (3 pár az egyes kohortokban).

16. táblázat: A három patológus 2X2* egyezéseinek tartományai.

	Összesített százalékos egyezés	Pozitív százalékos egyezés	Negatív százalékos egyezés
4B5 klón és PATHWAY HER-2/neu (CB11) összehasonlítása			
1. kohort	82,6 – 86,9%	97,3 – 100,0%	68,0% – 75,4%
2. kohort	88,2 – 95,5%	87,6 – 95,6%	86,1 – 95,4%
4B5 klón és a FISH összehasonlítása			
1. kohort	86,8 – 88,2%	90,7 – 94,2%	79,3 – 81,0%
2. kohort	87,4 – 89,9%	88,2 – 90,0%	84,5 – 91,8%
PATHWAY HER-2/neu (CB11) és FISH összehasonlítása			
1. kohort	79,9 – 84,0%	73,3 – 80,2%	89,7 – 89,7%
2. kohort	84,8% – 93,3%	86,7 – 92,5%	82,7 – 94,1%

* 0, 1+ = negatív. 2+ és 3+ = pozitív.

Következtetés: E tanulmányokból származó adatok szerint a 4B5 klón primer antitestnek a normális és neoplasztikus szövetek membránfestődését elkülönítő képessége specifikus és reprodukálható volt. A módszer-összehasonlító adatok azt mutatták, hogy a 4B5 klón primer antitest segítséget nyújt azon emlőrákos betegek azonosításában, akiknél szóba jöhet a Herceptin kezelés.

9. **Teljesítményjellemzők a BenchMark ULTRA készüléken a VUE DAB Detection Kit vagy *ultraView* Universal DAB Detection Kit használatával:**
- BenchMark ULTRA készülék laboratóriumok közötti festése és napok közötti reprodukálhatósága: Az Egyesült Államokban különálló intézmények három laboratóriuma vett részt a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság vizsgálatában. Negyvennyolc invazív emlőrák esetét [12-12 eset az egyes HER2 kategóriákból [0, 1+, 2+, 3+]] FFPE metasztázis, és mind a 12 festési ciklusban 1 pár PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t osztottunk el vizsgálati helyekre, ahol a festés VENTANA BenchMark ULTRA automata tárgylemezfestő készülékeken a javasolt festési protokoll és *ultraView* Universal DAB Detection Kit alkalmazásával történt. A kontroll céljára PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t és az esetek negatív Ig reagenssel festett második lemezét használták. Az esetek státuszát nem ismerő patológusok értékelték a lemezeket és adtak egy klinikai pontszámot (úgy mint 0, 1+, 2+, 3+). Az eredményeket a Ventana elemezte. Szabványos nevezéktant használva a 2 x 2-es táblázatok esetén, a vizsgálóhelyek közötti átlagos pozitív egyezést (APA) a $[2a/(2a+b+c)]$ képlet alapján, míg az átlagos negatív egyezést (ANA) a $[2d/(2d+b+c)]$ képlet alapján számítottuk ki. Valamennyi

helyszínen a klinikai összesítésen alapuló (pozitív, negatív) helyszínek közötti APA 90,0%-os volt (108/120) és az ANA 92,9%-os volt (156/168). A helyszínek páronkénti összehasonlításában az APA kiszámítása a/(a+c) szerint történt és az ANA kiszámítása d/(b+d) szerint történt. A helyszínek közötti APA arányok az alábbiak szerint alakultak: 93,0% (40/43), 87,2% (34/39) és 89,5% (34/38) az A helyszín kontra B helyszín, az A helyszín kontra C helyszín és a B helyszín kontra C helyszín esetében, sorrendben felsorolva. A helyszínek közötti ANA arányok az alábbiak szerint alakultak: 94,3% (50/53), 91,2% (52/57) és 93,1% (54/58) az A helyszín kontra B helyszín, az A helyszín kontra C helyszín és a B helyszín kontra C helyszín esetében, sorrendben felsorolva.

A következő táblázatokban az összes kiértékelő eredménye szerepel 3 X 3-as elrendezésben, a klinikai pontszám alapján, ahol a 2+ és 3+ elkülönül.

17. táblázat: A és B vizsgálóhely laboratóriumok közötti egyezési arányának 3 x 3-as analízise – 4B5 klón, BenchMark ULTRA és ultraView Universal DAB Detection Kit.

A helyszín	B helyszín			
	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Összesen	12	9	27	48
Összesített százalékos egyezés (OPA): n/N (%)				43/48 (89,6)

18. táblázat: A és C vizsgálóhely laboratóriumok közötti egyezési arányának 3 x 3-as analízise – 4B5 klón BenchMark ULTRA készülék és ultraView Universal DAB Detection Kit.

A helyszín	C helyszín			
	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Összesen	12	5	31	48
Teljes százalékos egyezés (OPA): n/N (%)				42/48 (87,5)

19. táblázat: B és C vizsgálóhely laboratóriumok közötti egyezési arányának 3 x 3-as analízise – 4B5 klón BenchMark ULTRA készülék és ultraView Universal DAB Detection Kit.

B helyszín	C helyszín			
	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Összesen	12	5	31	48
Teljes százalékos egyezés (OPA): n/N (%)				44/48 (91,7)

10. BenchMark ULTRA készülék napok közötti festési reprodukálhatósága:
A vizsgálati napok közötti reprodukálhatóság (IDR) része tartalmazott: klinikai pontszámoként (0, 1+, 2+, 3+) nagyjából három (3) eset tervezett megoszlással. A BenchMark ULTRA készüléken végzett összesen öt mérés abban az egy intézményben (C vizsgálóhely), amely a vizsgálat IDR részét vezette le, legalább 20 napig tartott, ezért nem volt két egymást követő festési nap. Az IDR APA és ANA arány, amelyek a C vizsgálóhelyen minden nap történő 4B5

klón festés klinikai meghatározásán alapulnak, egyaránt 100% volt. A klinikai pontszámokon alapuló napok közötti összehasonlítás összesített százalékos arányai (OPA) 100%-osak voltak minden egyes nap másik naphoz hasonlítása esetében, és az összes napra kombináltan is.

11. A BenchMark ULTRA festőplatform és a BenchMark XT festőplatform összehasonlító vizsgálata:

Az Egyesült Államokban két festő laboratórium és három olvasást végző helyszín vett részt a platform-összehasonlító vizsgálatban. 280 invazív emlőrákban eset [megközelítőleg 70 eset minden HER2 kategóriából (0, 1+, 2+, 3+)] FFPE metszetét két festési helyre (mindkét helyre 140 esetet) véletlenszerűen elosztottunk BenchMark XT készüléken és BenchMark ULTRA készüléken történő festésre a javasolt festési protokollok és a ultraView Universal DAB Detection Kit használatával. A kontroll céljára PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t és az esetek negatív Ig reagenssel festett második lemezét használták. Az 1. és 2. helyszínről származó festett eseteket négy lemezkészletre osztották, és készletenként kiosztották három képzett értékelőnek (patológusnak), egy értékelőnek az 1. helyszínen, egynek a 2. helyszínen és egynek a 3. helyszínen. Az eset státuszait és a festőplatformot nem ismerő patológusok értékelték a négy lemezkészletet, és megadták a klinikai pontszámot minden egyes esetre (ügymin 0, 1+, 2+, 3+). Az eredményeket a Ventana elemezte. A BenchMark ULTRA készüléken és a BenchMark XT készüléken végzett 4B5 klón antitest festés PPA értékei (és a kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok alsó határa) klinikai meghatározás alapján (pozitív, negatív), sorrendben az A, B és C kiértékelő esetén 91,6% (85,9), 91,2% (85,3) és 94,9% (89,3) voltak. A BenchMark ULTRA készüléken és a BenchMark XT készüléken végzett 4B5 klón antitestfestés NPA értékei (és a kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumok alsó határa) klinikai meghatározás alapján (pozitív, negatív), sorrendben az A, B és C kiértékelő esetén 91,9 (85,8), 93,8% (88,3), és 99,3 (96,3) voltak. A BenchMark ULTRA készüléken és a BenchMark XT készüléken végzett 4B5 klón festések közötti OPA, a klinikai meghatározás (pozitív, negatív) 2 X 2 analízisén alapulva, sorrendben az A, B és C kiértékelő esetén 91,8%, 92,5% és 97,4% volt. A platformok közötti egyezési arányok 3x3 prezentációja az egyes kiértékelők esetében, klinikai pontok (0/1+, 2+, 3+) alapján az alábbi táblázatokban szerepel:

20. táblázat: A BenchMark ULTRA készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának 3x3 analízise – A kiértékelő.

BenchMark ULTRA berendezés	BenchMark XT berendezés			
A értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Összesen	96	47	124	267
Összesített százalékos egyezés:				226/267 (84,6) (79,8-88,5)
n/N (%) (95% KI)				

21. táblázat: A BenchMark ULTRA készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának 3x3 analízise – B kiértékelő.

BenchMark ULTRA berendezés	BenchMark XT berendezés			
B értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Összesen	69	68	130	267
Összesített százalékos egyezés:				242/267 (90,6) (86,5-93,6)
n/N (%) (95% KI)				

22. táblázat: A BenchMark ULTRA készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának 3 X 3 analízise – C kiértékelő.

BenchMark ULTRA berendezés	BenchMark XT berendezés			
C értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Összesen	66	52	149	267
Összesített százalékos egyezés: 257/267 (96,3) (93,2-98,0) n/N (%) (95% KI)				

12. A platform-összehasonlító vizsgálat mintáinak patológusok közötti reprodukálhatósága:

Pozitív és negatív egyezési arányokat – kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallummal – számoltunk ki a kiértékelők közötti hat lehetséges páronkénti összehasonlításhoz minden platform esetén.

A BenchMark ULTRA berendezés esetében a PPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 94,7% (126/133), 98,2% (111/113), 98,2% (111/113), 89,4% (126/141), 78,7% (111/141) és 83,5% (111/133) volt. Az NPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 88,8% (119/134), 80,5% (124/154), 85,7% (132/154), 94,4% (117/124), 98,4% (124/126) és 98,5% (132/134) volt. Az OPA arány a legmagasabb az A és a B értékelő között volt (91,8%) és a B és a C (91,0%), valamint az A és a C értékelő között alacsonyabb volt (88,8%).

A BenchMark XT berendezés esetében a PPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 94,9% (130/137), 98,3% (116/118), 98,3% (116/118), 90,9% (130/143), 81,1% (116/143) és 84,7% (116/137) volt. Az NPA értékek az A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A és C vs. B kiértékelők esetén sorrendben 90,0% (117/130), 81,9% (122/149), 85,9% (128/149), 94,4% (117/124), 98,4% (122/124) és 98,5% (128/130) voltak. Az OPA arány a legmagasabb az A és a B értékelő között volt (92,5%) és a B és a C (91,4%), valamint az A és a C értékelő között alacsonyabb volt (89,1%).

13. A /VIEW DAB Detection Kit és *ultraView* Universal DAB Detection Kit összehasonlító vizsgálata:

140 invazív emlőrák eset [megközelítőleg 35 eset minden HER-2 kategóriából (0, 1+, 2+, 3+)] FFPE metszetének 1. vizsgálóhelyi kohortját egy összehasonlító vizsgálat során használtuk fel az /VIEW DAB Detection Kit és az *ultraView* Universal DAB Detection Kit összehasonlítására, amely során BenchMark ULTRA automatizált metszefestő eszközön 4B5 klón-tel festettünk. Az Egyesült Államokban egy festő laboratórium és három olvasást végző helyszín vett részt a detektálást összehasonlító vizsgálatban. A BenchMark ULTRA készüléken történő 4B5 klón antitest festés során az /VIEW DAB Detection Kit és *ultraView* Universal DAB Detection Kit módszerek segítségével nyert eredmények közötti PPA értékek, klinikai meghatározások alapján (pozitív, negatív), az A, B és C kiértékelők esetén sorrendben 95,8% (68/71), 96,9% (63/65), és 96,5% (55/57), míg a detektálási módszerek közötti NPA értékek az A, B és C kiértékelők esetén sorrendben 90,8% (59/65), 91,5% (65/71), és 97,5% (77/79) voltak. A detektálókészletek közötti OPA értékek az A, B és C kiértékelők esetén sorrendben 93,4% (127/136), 94,1% (128/136) és 97,1% (132/136) voltak. A detektálás-összehasonlítás egyezési arányainak 3x3-as bemutatása az egyes kiértékelők esetében, klinikai pontszámok (0/1+, 2+, 3+) alapján az alábbi táblázatokban szerepel:

23. táblázat: A kiértékelő, /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit egyezési arányok 3 x 3-as analízise – 4B5 klón festés BenchMark ULTRA készüléken.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
A értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Összesen	46	25	65	136
Összesített százalékos egyezés: 119/136 (87,5) (80,9-92,0) n/N (%) (95% KI)				

24. táblázat: B kiértékelő, /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit egyezési arányok 3 x 3-as analízise – 4B5 klón festés BenchMark ULTRA készüléken.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
B értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Összesen	33	32	71	136
Összesített százalékos egyezés: 128/136 (94,1) (88,8-97,0) n/N (%) (95% KI)				

25. táblázat: C kiértékelő, /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit egyezési arányok 3 x 3-as analízise – 4B5 klón festés BenchMark ULTRA készüléken.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
C értékelő	3+	2+	0, 1+	Összesen
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Összesen	32	25	79	136
Összesített százalékos egyezés: 132/136 (97,1) (92,7-98,9) n/N (%) (95% KI)				

14. A detektálást összehasonlító vizsgálat mintáinak patológusok közötti reprodukálhatósága:

Kiszámították a pozitív és negatív egyezési arányt a kétoldali pontszám 95% konfidencia-intervallumával, a hat lehetséges értékelőpárra vonatkoztatva, az egyes módszerekre vonatkoztatva az értékelők között.

A /VIEW DAB Detection Kit berendezés esetében a PPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 100,0% (69/69), 98,2% (56/57), 96,5% (55/57), 93,2% (69/74), 75,7% (56/74) és 79,7% (55/69) volt. Az NPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 92,5% (62/67), 77,2% (61/79), 82,3% (65/79), 100,0% (62/62), 98,4% (61/62) és 97,0% (65/67) volt. Az összesített egyezési arány a legmagasabb az A és a B értékelő között volt (96,3%) és az A és a C (86,0%), valamint a B és a C értékelő között alacsonyabb volt (88,2%).

A *ultraView* Universal DAB Detection Kit berendezés esetében a PPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 96,9% (63/65), 98,2% (56/57), 98,2% (56/57), 88,7% (63/71), 78,9% (56/71) és 86,2% (56/65) volt. Az NPA arány az A kontra B értékelőre, az A kontra C értékelőre, a B kontra C értékelőre, a B kontra A értékelőre, a C kontra A értékelőre és a C kontra B értékelőre sorrendben 88,7% (63/71), 81,0% (64/79), 88,6% (70/79), 96,9% (63/65), 98,5% (64/65) és 98,6% (70/71), volt. Az összesített egyezési arányok megegyezők voltak minden egyes értékelő esetében, 92,6% (126/136), 88,2% (120/136) és 92,6% (126/136) sorrendben az A kontra B, az A kontra C és a B kontra C értékelő esetében.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK GYOMORSZÖVETBŐL SZÁRMAZÓ MINTÁK ESETÉBEN

1. A BenchMark XT készüléken a mérések közötti megismételhetőséget egy 5 (nem egymást követő) napos időszakban, 5 mérés során vizsgáltuk. Öt metszet, melyek három, 0, 1+, 2+ és 3+ HER2 expressziós pontszámú gyomorszövetmintát tartalmaztak, a pozitív/negatív értéken belül 100%-os egyezést mutattak minden szövet esetén.
2. A BenchMark XT készüléken a mérésen belüli megismételhetőséget 28 metszeten vizsgáltuk, melyek három, 0, 1+, 2+ és 3+ HER2 expressziós pontszámú gyomorszövetmintát tartalmaztak. Minden mintának minden szövettípus esetén egyenlő pontszáma volt a pozitív/negatív értéken belül.
A platformon belüli megismételhetőséget három BenchMark XT készülék között végeztük. Ezekben a mérésekben két különböző, több szövetet (három 0, 1+, 2+, és 3+ HER2 expressziós pontszámú gyomorszövetmintát) tartalmazó blokk mind a 30 metszetének minden szövettípus esetén egyenlő pontszáma volt a pozitív/negatív értéken belül.
A platformon belüli megismételhetőséget három BenchMark ULTRA készülék között teszteltük. Ezekben a mérésekben az egy, több szövetet tartalmazó blokk mind a 15 metszete egyenlő pontszámot kapott a pozitív/negatív értéken belül minden szövettípus esetén.
A platformok közötti megismételhetőséget három BenchMark XT és három BenchMark ULTRA készülék között teszteltük. Ezekben a mérésekben az egy, több szövetet tartalmazó blokk mind a 30 metszete egyenlő pontszámot kapott a pozitív/negatív értéken belül minden szövettípus esetén.
3. Az *VIEW* DAB Detection Kit és *ultraView* Universal DAB Detection Kit összehasonlítása gyomorszövetből származó minták esetén:
4B5 klón segítségével végeztük a detektálókészletek összehasonlító tesztelését két készülék között (BenchMark XT és BenchMark ULTRA készülék) az *VIEW* DAB Detection Kit és az *ultraView* Universal DAB Detection Kit használatával. A tesztelés során kétszázöt szövetmintát használtunk fel. Meghatároztuk a festett metszetek pozitív/negatív klinikai pontszámát.
A morfológiai és háttér-elfogadhatósági arány mind a detektálókészletek, mind a készülékek esetén 100% volt. A detektálókészletek közötti pozitív és negatív klinikai meghatározások direkt összehasonlítása a következő táblázatokban szerepel az egyes készülékekre vonatkozóan.

26. táblázat: A *ultraView* Universal DAB Detection Kit klinikai értékelése az *VIEW* DAB Detection Kit készlettel szemben a BenchMark XT készüléken.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	21	0	21
Negatív	0	189	189
Összesen	21	189	210
	n/N	%	
Pozitív százalékos egyezés	21/21	100	
Negatív százalékos egyezés	189/189	100	
Összesített százalékos egyezés	210/210	100	

27. táblázat: A BenchMark XT és BenchMark ULTRA festési platformok klinikai értékelésének összehasonlítása az *ultraView* Universal DAB Detection Kit használatával.

BenchMark XT Festési platform <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA Festési platform <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	20	1	21
Negatív	0	189	189
Összesen	20	190	210
	n/N	% (95% KI)	
Pozitív százalékos egyezés	20/20	100 (83,9-100)	
Negatív százalékos egyezés	189/190	99,5 (97,1-99,9)	
Összesített százalékos egyezés	209/210	99,5 (97,4-99,9)	

4. 4B5 klón és HercepTest összehasonlítása humán gyomorrákban:
Egy vak külső vizsgálatban hasonlítottuk össze a 4B5 klón és a Dako HercepTest festési teljesítményét egy BenchMark XT készüléken. Körülbelül 239 gyomorrákos esetet használtak fel a vizsgálatban, valamint 159 esetet a TARGOS laboratóriumból, a ToGA vizsgálatból, amely a Herceptin-nel kezelt betegek HER2 státuszát és klinikai eredményét vizsgálta. A laboratóriumban a mintákat 4B5 klón-tel és HercepTest-tel festették. Egy patológus pontosztta a mintákat egy 0/1+, 2+ és 3+ skálán. A pozitívnak a 2+ és 3+ pontszámú esetek számítanak, negatívnak pedig a 0 és 1+ pontszámúak.
A 28 és 29 táblázat az egyezési arányokat mutatja a 4B5 klón és a HercepTest között, a szövet eredete szerint lebontva. A 28. táblázat a pozitív és negatív kimeneteket hasonlítja össze, míg a 29. táblázat egy 3 kategóriából álló, 0/1+, 2+ és 3+ beosztású IHC skálát alkalmaz. A 28. és 29. táblázatban a teljes egyezés az összes szövetre nézve sorrendben 91,0% és 95,3%.

28. táblázat: A 4B5 klón (IHC) és a HercepTest százalékos egyezési arányai és 95%-os konfidenciaintervallumai, szövetforrás szerint felosztva. Mindkét IHC teszt felosztása pozitív és negatív (0/1+ vs 2+/3+) esetekre történt.

n	Teljes százalékos egyezés (95%-os KI)	n	Pozitív százalékos egyezés (95%-os KI)	n	Negatív százalékos egyezés (95%-os KI)
362/398	91,0 (87,7-93,4)	46/56	82,1 (70,2-90,0)	316/342	92,4 (89,1-94,8)

29. táblázat: A 4B5 klón (IHC) és a HercepTest pontszámok teljes százalékos egyezése és 95%-os konfidenciaintervallumai, szövetforrás szerint felosztva. Az IHC tesztek 0/1+, 2+ vagy 3+ pontot kaptak.

Szövetforrás	n	Teljes százalékos egyezés (95%-os KI)
TMA & ToGA	355/398	89,2 (85,8-91,9)

5. A 4B5 klón laboratóriumok közötti reprodukálhatósága: A vizsgálatot három tesztelési helyszínen folytatták le. A mintákat a 4B5 klón IHC klinikai pontszám alapján választották be a vizsgálatba, így a pozitív (3+) és a negatív (0, 1+) esetek száma közel megegyezett. Emellett négy 2+ pontszámú gyomorrákos mintát is tanulmányoztak.
Mind a három vizsgálóhely BenchMark XT és BenchMark ULTRA platformot használt a platformonkénti 4 festés elvégzéséhez. Az eseteket a festéshez rétegzett randomizációs eljárás során randomizálták, amely úgy sorolta be az eseteket, hogy minden mérés tartalmazzon minden fajta HER2 pontszámú gyomorrák esetet. Az egyes vizsgálóhelyek egyes berendezésein ugyanazokkal az esetekkel végezték a futtatásokat. Minden vizsgálóhelyen, minden eset egyik mintáját 4B5 klón-tel és az adott eset egy másik mintáját CONFIRM Negative

Control Rabbit Ig-vel festették meg a BenchMark ULTRA platformon. Az azonos esethez tartozó másik metszéspárt minden vizsgálóhelyen hasonlóan festettek meg a BenchMark XT platformon. Az esethez tartozó metszeteket minden vizsgálóhelyen egy szakképzett kiértékelő személyi pontozta, aki az összes minta esetén előzőleg meghatározott IHC klinikai besorolást nem ismerte.

Az összes értékelhető esetenél a teljes egyezés mindhárom vizsgálóhely közötti összehasonlításban 100%-os volt, mind a BenchMark ULTRA platformon, mind pedig a BenchMark XT platformon. A BenchMark ULTRA és a BenchMark XT platform értékelhető esetei közötti teljes egyezés mindhárom vizsgálóhelyen 100%-os volt. A háttér és morfológiai elfogadhatósági arány az A és C vizsgálóhelyek mindkét platformján minden esetben 100%-os volt, a B vizsgálóhely mindkét platformján pedig >95%. Lásd az alábbi táblázatokat.

30. táblázat: Teljes klinikai értékelés egyezése a vizsgálóhelyek között: Minden értékelhető eset.

BenchMark ULTRA berendezés	Teljes százalékos egyezés
A és B vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
A és C vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
B és C vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
BenchMark XT berendezés	Teljes százalékos egyezés
A és B vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
A és C vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
B és C vizsgálóhely összehasonlítása: n/N (%) (95% KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)

31. táblázat: Teljes klinikai értékelés egyezése a platformok között: Minden értékelhető eset.

BenchMark ULTRA és BenchMark XT készülék összehasonlítása	Teljes százalékos egyezés
A vizsgálóhely: n/N (%) (95% KI)	40/40 (100%) (91,2 – 100)
B vizsgálóhely: n/N (%) (95% KI)	34/34 (100%) (89,8 – 100)
C vizsgálóhely: n/N (%) (95% KI)	32/32 (100%) (89,3 – 100)

32. táblázat: Háttér festés és morfológiai elfogadhatósági értékek: Minden eset.

BenchMark ULTRA berendezés	A helyszín	B helyszín	C helyszín
Morfológiai elfogadhatósági értékek	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Háttér-elfogadhatósági értékek	44/44 (100%)	42/44 (95,5%)	44/44 (100%)
BenchMark XT berendezés	A helyszín	B helyszín	C helyszín
Morfológiai elfogadhatósági értékek	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Háttér-elfogadhatósági értékek	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)

6. A BenchMark és BenchMark GX festőplatformok összehasonlító vizsgálata a BenchMark XT festőplatformmal:

Három gyomorrákos eset (megközelítőleg 50 eset/TMA) FFPE TMA metszetét festették meg BenchMark XT, BenchMark, és BenchMark GX készüléken az *ultraView* Universal DAB Detection Kithoz és *VIEW* DAB Detection Kithoz javasolt megfelelő festési protokollok használatával. A kontroll céljára PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides-t és mindegyik TMA negatív Ig reagenssel festett második lemezét használták. A megfestett metszeteket egy kiértékelő (patológus) értékelte.

A 4B5 klón antitestfestés teljes egyezési aránya (és a kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallum alsó határa) klinikai értékelés alapján (pozitív, negatív) a következők szerint alakult: BenchMark készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,0% (94,2-99,3), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97,4% (93,6-99,0), BenchMark készülék versus BenchMark XT készülék és *VIEW* DAB Detection Kit 96,6% (92,7-98,4), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT készülék és *VIEW* DAB Detection Kit 95,9% (91,8-98,0).

A 4B5 klón antitestfestés pozitív egyezési aránya (és a kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallum alsó határa) klinikai értékelés alapján (pozitív, negatív) a következők szerint alakult: BenchMark készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91,7% (64,4-98,5), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78,6% (52,4-92,4), BenchMark készülék versus BenchMark XT és *VIEW* DAB Detection Kit 80,0% (54,8-93,0), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT és *VIEW* DAB Detection Kit 73,3% (48,0-89,1).

A 4B5 klón festés negatív egyezési aránya (és a kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallum alsó határa) klinikai értékelés alapján (pozitív, negatív) a következők szerint alakult: BenchMark készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,5% (94,8-99,6), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT készülék és *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99,3% (96,1-99,9), BenchMark készülék versus BenchMark XT készülék és *VIEW* DAB Detection Kit 98,1% (94,6-99,4), BenchMark GX készülék versus BenchMark XT készülék és *VIEW* DAB Detection Kit 98,1% (94,5-99,3). Az egyezési arányok 2 x 2-es prezentációja az összes összehasonlításhoz, klinikai meghatározás alapján (pozitív, negatív), az alábbi táblázatokban látható.

33. táblázat: A BenchMark készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának *ultraView* Universal DAB Detection Kithal végzett 2 X 2-es analízise.

4B5 klón az <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kithal			
BenchMark berendezés	BenchMark XT berendezés		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	11	2	13
Negatív	1	133	134
Összesen	12	135	147
	n/N % (95% KI)		
Összesített százalékos egyezés	144/147	98,0% (94,2-99,3)	
Pozitív százalékos egyezés	11/12	91,7% (64,6-98,5)	
Negatív százalékos egyezés	133/135	98,5% (94,8-99,6)	

34. táblázat: A BenchMark GX készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának *ultraView Universal DAB Detection Kit* kittel végzett 2 X 2-es analízise.

4B5 klón az <i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
BenchMark GX berendezés	BenchMark XT berendezés		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	11	1	12
Negatív	3	140	143
Összesen	14	141	155
	n/N	% (95% KI)	
Összesített százalékos egyezés	151/155	97,4% (93,6-99,0)	
Pozitív százalékos egyezés	11/14	78,6% (52,4-92,4)	
Negatív százalékos egyezés	140/141	99,3% (96,1-99,9)	

35. táblázat: A BenchMark készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának *VIEW DAB Detection Kittel* végzett 2 X 2-es analízise.

4B5 klón az <i>VIEW DAB Detection Kit</i>			
BenchMark berendezés	BenchMark XT berendezés		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	12	3	15
Negatív	3	156	159
Összesen	15	159	174
	n/N	% (95% KI)	
Összesített százalékos egyezés	168/174	96,6% (92,7-98,4)	
Pozitív százalékos egyezés	12/15	80,0% (54,8-93,0)	
Negatív százalékos egyezés	156/159	98,1% (94,6-99,4)	

36. táblázat: A BenchMark GX készülék és a BenchMark XT készülék platformok közötti egyezési arányának *VIEW DAB Detection Kittel* végzett 2 X 2-es analízise.

4B5 klón az <i>VIEW DAB Detection Kit</i>			
BenchMark GX berendezés	BenchMark XT berendezés		
	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	11	3	14
Negatív	4	154	158
Összesen	15	157	172
	n/N	% (95% KI)	
Összesített százalékos egyezés	165/172	95,9% (91,8-98,0)	
Pozitív százalékos egyezés	11/15	73,3% (48,0-89,1)	
Negatív százalékos egyezés	154/157	98,1% (94,5-99,3)	

Összefoglalás: A vizsgálatokból származó adatok azt mutatják, hogy a VENTANA HER2 (4B5) képessége emlő és gyomor neoplasztikus szövet megfelelő festésére specifikus és reprodukálható volt. A módszer-összehasonlító és laboratóriumok közötti reprodukálhatósági adatok azt mutatták, hogy a VENTANA HER2 (4B5) segítséget nyújt azon emlő- és gyomorrákos betegek betegségének értékelésében, akiknél szóba jöhet a Herceptin kezelés.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK – PERJETA AND KADCYLA

HER2 Emlőszövet - A Perjeta és a Kadcyła pivotális vizsgálatának belépési tesztjéhez tartozó módszer-összehasonlító vizsgálat emlőrákban

A Perjeta és Kadcyła vizsgálatok kohorszainak belépési tesztjeivel való ekvivalencia megállapítása céljából a vizsgálati mintákon festéses VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody vizsgálatot végeztek. A Perjeta vizsgálat során értékelt 2753 mintát és a Kadcyła vizsgálat során értékelt 99 mintát megfestették VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5))-vel. Megállapították a pozitív (PPA), negatív (NPA) és általános (OPA) százalékos egyezési arányokat. A 95%-os KI.-ot (kétoldalas 95%-os konfidenciaintervallumot) a pontozási módszerrel számították.

37. táblázat: A 4B5 klón és a Dako vizsgálatok HER2 státusz egyezése az összes HER2-re értékelhető alanyánál. Az IHC értékelhető alanyok HER2 státusza pozitív vagy negatív, amit a 4B5 klón és a belépési IHC vizsgálattal állapítanak meg.

Vizsgálat	4B5 klón pontszám [b]	DAKO HER2 státusz [a] [b]		
		Pozitív	Negatív	Összesen
Perjeta és Kadcyła	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Összesen	2558	272	2830
Pozitív százalékos egyezés (PPA) n/N (%) (95%-os KI)		2380/2558 (93,0) (92,0-94,0)		
Negatív százalékos egyezés (NPA) n/N (%) (95%-os KI)		257/272 (94,5) (91,1-96,6)		
Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)		2637/2830 (93,2) (92,2-94,1)		

[a] Pozitív = IHC pozitív és/vagy ISH amplifikált. Negatív = IHC negatív és nem ISH amplifikált vagy ISH nem-amplifikált és nem IHC pozitív.

[b] IHC: Pozitív = 3+; Negatív = 0, 1+, vagy 2+.

38. táblázat: A 4B5 klón és a Dako vizsgálatok IHC státusz egyezése az összes IHC-re értékelhető alanyánál. Az IHC értékelhető alanyok HER2 státusza pozitív vagy negatív, amit a 4B5 klón és a belépési IHC vizsgálattal állapítanak meg.

Vizsgálat	4B5 klón státusz [a]	Dako HercepTest státusz [a]		
		Pozitív	Negatív	Összesen
Perjeta és Kadcyła	Pozitív	2330	65	2395
	Negatív	21	414	435
	Összesen	2351	479	2830
	Pozitív százalékos egyezés (PPA) n/N (%) (95%-os KI)	2330/2351 (99,1) (98,6-99,4)		
	Negatív százalékos egyezés (NPA) n/N (%) (95%-os KI)	414/479 (86,4) (83,1-89,2)		
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	2744/2830 (97,0) (96,3-97,5)		
Perjeta	Pozitív	2267	63	2330
	Negatív	10	399	409
	Összesen	2277	462	2739
	Pozitív százalékos egyezés (PPA) n/N (%) (95%-os KI)	2267/2277 (99,6) (99,2-99,8)		
	Negatív százalékos egyezés (NPA) n/N (%) (95%-os KI)	399/462 (86,4) (82,9-89,2)		
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	2666/2739 (97,3) (96,7-97,9)		
Kadcyła	Pozitív	63	2	65
	Negatív	11	15	26
	Összesen	74	17	91
	Pozitív százalékos egyezés (PPA) n/N (%) (95%-os KI)	63/74 (85,1) (75,3-91,5)		
	Negatív százalékos egyezés (NPA) n/N (%) (95%-os KI)	15/17 (88,2) (65,7-96,7)		
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	78/91 (85,7) (77,1-91,5)		

[a] Pozitív = 3+; Negatív = 0, 1+, vagy 2+.

39. táblázat: A 4B5 klón és a Dako vizsgálatok IHC pontszám egyezése az összes IHC-re értékelhető alanyánál. Az IHC értékelhető alanyok HER2 státusza pozitív vagy negatív, amit a 4B5 klón és a belépési IHC vizsgálattal állapítanak meg.

Vizsgálat	4B5 klón pontszám	Dako HercepTest pontszám		
		3+	2+	0/1+
Perjeta és Kadcyła	3+	2330	64	1
	2+	12	235	15
	0/1+	9	26	138
	Összesen	2351	325	154
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	2703/2830 (95,5) (94,7-96,2)		
Perjeta	3+	2267	62	1
	2+	9	226	13
	0/1+	1	24	136
	Összesen	2277	312	150
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	2629/2739 (96,0) (95,2-96,7)		
Kadcyła	3+	63	2	0
	2+	3	9	2
	0/1+	8	2	2
	Összesen	74	13	4
	Általános százalékos egyezés (OPA) n/N (%) (95%-os KI)	74/91 (81,3) (72,1-88,0)		

40. táblázat: A 4B5 klón festés elfogadhatósága. IHC tesztelt alanyok. Az IHC festés akkor számít elfogadhatónak, ha megállapítható egy érvényes IHC pontszám (0, 1+, 2+, vagy 3+). A nem elfogadható festődés oka lehet a nem elfogadható negatív kontroll, a szövetszerveség, nem elegendő tumorszövet, nem elfogadható háttér és nem elfogadható morfológia.

Paraméter	Perjeta	Kadcyla	Perjeta és Kadcyla
Kezdeti IHC tesztek száma	2753	99	2852
Festődés kezdeti elfogadhatósága n/N (%) (95% KI.)	2708/2753 (98,4) (97,8, 98,8)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2800/2852 (98,2) (97,6, 98,6)
Ismételt IHC tesztek száma	40	0	40
Festődés végső elfogadhatósága n/N (%) (95% KI.)	2746/2753 (99,7) (99,5, 99,9)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2838/2852 (99,5) (99,2, 99,7)

HIBAEELHÁRÍTÁS

- Ha a pozitív kontroll a vártnál gyengébb festést mutat, a készülék aktuális ciklusában futtatott más pozitív kontrollokat kell megvizsgálni, hogy eldönthessék, hogy ez vajon a primer antitestnek, vagy valamelyik közös szekunder reagensnek köszönhető-e.
- Ha a pozitív kontroll negatív eredményt ad, ellenőrizze, hogy a megfelelő vonalkód-címkeket használta-e. Ha a vonalkód helyes, más pozitív kontrollokkal kell dolgozni ugyanazon a készüléken, hogy meghatározza, hogy a hiba a primer antitestnek vagy valamelyik közös szekunder reagensnek köszönhető-e. Előfordulhat, hogy a szövetek mintavételezése, fixálása vagy paraffinmentesítése helytelenül történt. A szövet mintavételezése, a tárolás és a fixálás során a megfelelő eljárást kell alkalmazni.
- Ha nem távolították el az összes paraffint, akkor a festődés hiányozhat. A paraffinmentesítési műveletet meg kell ismételni.
- Ha a specifikus antitestfestés túl intenzív, rövidített inkubációs idő mellett meg kell ismételni a mérést, amíg a kívánt festési intenzitást meg nem kapjuk.
- Ha a szövetszövetek lemosódnak a metszetről, bizonyosodjon meg arról, hogy pozitív töltésű metszetet használ.
- Ha a gyomorkarcinómás metszetben a tumoros terület közvetlen közelében az ép nyálkahártyában a membránfestés értékelését zavaró sejtmag- és citoplazma-festődés észlelhető, az eset ISH-val ellenőrizhető.
- A javító intézkedéseket lásd az Eljárás lépésről lépésre című fejezetben, a készülék Kezelői kézikönyvében, vagy vegye fel a kapcsolatot a helyi képviselővel.

IRODALOMJEGYZÉK

- Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232: 1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO*. 1987; 6: 605-610.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings L, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
- 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.
- Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69: 57-58.
- Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*. 1997;75: 667-1673.
- Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 1990;161:15-25.
- Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. *Eur J Cancer*. 1993;29A:1018-1023.
- DePotter CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.

- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- 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.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
- CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
- 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66(4):194-199.
- Omata M, Liew CT, Ashcava 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
- 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.
- Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*. 1994;47:816-22.
- Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschhoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-182.
- Rhodes A, Sarson J, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(4): 621-32.
- van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2 status in breast cancer. *Mod Pathol*. 2009;22(7):879-886.
- Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neu Test 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Virchows Arch*. 2009;454(3):241-8 (Epub: 24 Jan 2009).
- Itoh H, Kato N, Serizawa A, Itoh T, Umemura S, Osamura RY. HER2 Rabbit Monoclonal Antibody 4B5 and Silver SISH: High Performance in Surgical Pathology for Appropriate Patient Care. *Laboratory Investigation*. 2009;89(1): 48A.

28. Powell WC, Roche PC, Tubbs RR. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(6):569.
29. Carbone A, Botti G, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn*. 2008;10(6): 527-36.
30. Wolff AC, Hammond ME, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18.
31. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
32. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):461-71.
33. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
34. <http://www.kadcyla.com/hcp>
35. <http://www.perjeta.com/hcp>

SZELLEMI TULAJDONJOG

A BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView*, PATHWAY, VENTANA, és a VENTANA logó a Roche védjegyei.

Minden más márkanév a megfelelő tulajdonos védjegye.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

ELÉRHETŐSÉGEK



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com