

**HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis)****Kód GE001**

50 testů k použití s Dako Omnis

Pro diagnostiku in vitro.

## Obsah

1.	Účel použití .....	3
2.	Souhrn a výklad.....	3
3.	Princip metody.....	3
4.	Dodané materiály .....	3
5.	Další potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky.....	4
6.	Volitelné činidlo .....	5
7.	Substituty komponent soupravy .....	5
8.	Bezpečnostní opatření.....	5
9.	Uchovávání .....	6
10.	Příprava vzorku .....	6
10.1	Řezy zalité v parafínu.....	6
10.2	Tkáňové řezy .....	6
11.	Příprava reagensie .....	6
12.	Postup barvení přístrojem Dako Omnis .....	7
12.1	Poznámky k postupu.....	7
12.2	Postup před barvením.....	7
12.3	Protokol barvení.....	8
12.4	Postup po barvení.....	8
13.	Kontrola kvality .....	8
13.1	Kontrolní sklíčko (dodané), .....	8
13.2	Tkáň pro pozitivní kontrolu .....	8
13.3	Tkáň pro negativní kontrolu.....	8
13.4	Nespecifické Negative Control Reagent (volitelné).....	8
13.5	Ověření stanovení.....	8
14.	Barvení a interpretace výsledků barvení .....	8
15.	Hodnocení tkáně .....	9
15.1	Hodnocení kontrolního sklíčka (dodávané).....	10
15.2	Další doporučení pro interpretaci barvení HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis).....	10
16.	Omezení.....	10
16.1	Všeobecná omezení .....	10
16.2	Omezení specifická pro tento produkt .....	11
17.	Charakteristiky účinnosti.....	11
17.1	Analytická citlivost.....	11
17.2	Analytická specifčnost.....	11
17.3	Přesnost .....	12
18.	Klinické charakteristiky výkonnosti.....	13
18.1	Hodnocení výkonu, porovnání metod IHC versus IHC.....	13
18.2	Hodnocení výkonu, porovnání metod IHC versus FISH.....	13
19.	Řešení problémů .....	14
20.	Literatura .....	15
21.	Vysvětlivky k symbolům.....	16

## 1. Účel použití

Pro diagnostiku in vitro.

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) je semikvantitativní imunohistochemický test založený na primární králičí monoklonální protilátce (klon DG44) a vizualizačním činidlu, které je specifické pro tento test. Test stanovuje hyperexpresi proteinu HER2 ve tkáních s karcinomem prsu, které jsou fixované ve formalínu, zalité v parafínu (FFPE) a zpracované pro histologické vyšetření. HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) je určen jako pomůcka k hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u kterých se zvažuje léčba prostředkem Herceptin® (trastuzumab), (viz příbalový leták k výrobku Herceptin®).

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) je pro automatizované barvení pomocí přístroje Dako Omnis.

*HercepTest™ a Herceptin® jsou ochranné známky společnosti Genentech, Inc. a/nebo F. Hoffmann-La Roche Ltd.; HercepTest™ podléhá výhradní licenci k ochranné známce společnosti Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.*

*Protilátku chráněnou licenci vytvořila společnost Epitomics Inc. (společnost Abcam) za použití vlastní technologie Abcam králičí monoklonální protilátky chráněné patenty č. 5,675,063 a 7,402,409.*

## 2. Souhrn a výklad

Lidský gen *HER2* (rovněž nazýván jako *ERBB2* nebo *NEU*) kóduje protein označovaný jako protein HER2 nebo p185HER2. Protein HER2 je membránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou, který je homologní s receptorem epidermálního růstového faktoru (EGFR nebo HER1).<sup>1-3</sup> Protein HER2 je normální buněčná komponenta, exprimována mnoha typy epitelálních buněk.<sup>3</sup> U části pacientů s rakovinou prsu je protein HER2 hyperexprimován jako součást procesu maligní transformace a progresu tumoru.<sup>4</sup> Hyperexprese proteinu HER2 na povrchu buněk rakoviny prsu znamená, že se může jednat o cíl terapie protilátkou.

Herceptin® (trastuzumab) je lidská monoklonální protilátka<sup>5</sup>, která se vysokou afinitou váže na protein HER2 a prokázalo se, že inhibuje proliferaci lidských rakovinných buněk hyperexprimujících protein HER2 in vitro a in vivo.<sup>6-8</sup> Mnoho klinických studií prokázalo, že trastuzumab je účinný a bezpečný při léčbě pacientů s HER2-pozitivní rakovinou prsu.<sup>9-12</sup>

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) se interpretuje pro hyperexpresi proteinu HER2 jako negativní (intenzita zbarvení 0 a 1+), slabě pozitivní (intenzita zbarvení 2+) a silně pozitivní (intenzita zbarvení 3+). HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) není vhodný k poskytování informací o prognóze pacientovi a lékaři a nebyl pro tento účel ověřen.

## 3. Princip metody

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) obsahuje činidla a protokol nutný k dokončení zcela automatizovaného imunohistochemického postupu IHC barvení vzorků FFPE pomocí přístroje Dako Omnis. Po inkubaci s primární monoklonální králičí protilátkou HER2 připravenou k použití (klon DG44) tato souprava využívá na základě dextranové technologie bez biotinu vizualizační činidlo připravené k použití, které je pro tento test specifické. Toto činidlo obsahuje molekuly sekundárního koziho anti-králičího imunoglobulinu i molekuly křenové peroxidázy navázané na společný hlavní řetězec dextranového polymeru, a tak eliminuje nutnost sekvenční aplikace vazby protilátky a konjugátu peroxidázy. Enzymatická přeměna následně přidaného chromogenu DAB+ vede k vytvoření viditelného reakčního produktu v místě antigenu. Vzorek může být poté kontrastně podbarven a překryt krycím sklíčkem. Výsledky se vyhodnocují pomocí mikroskopie ve světlém poli. Obsažena jsou Control Slides připravená k použití (kontrolní sklíčka s buňkami), která obsahují čtyři linie lidských buněk karcinomu prsu FFPE k ověření výkonu činidel vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) po vložení nebo opětovném vložení činidel vyhrazených šarží do přístroje Dako Omnis. Čtyři buněčné linie zobrazují rozsah exprese proteinu HER2, a tedy úroveň intenzity zbarvení, která zahrnuje žádné zbarvení HER2 (negativní), nízkou, střední a vysokou intenzitu zbarvení HER2.

Podrobné pokyny pro vkládání a vyjímání sklíček, reagensů, zásobních roztoků a pro manipulaci s odpadními látkami naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

## 4. Dodané materiály

Níže uvedené materiály stačí na 50 testů: 50 sklíček na tkáň, 10 Control Slides inkubovaných s primární protilátkou proti proteinu HER2 a 10 sklíček inkubovaných s volitelným Negative Control Reagent (viz kapitola 6: Volitelné činidlo). Tato souprava je připravena přímo k použití s přístrojem Dako Omnis. Další informace naleznete v uživatelské příručce k systému Dako Omnis.

Množství

Popis

1 x 22,5 ml

**EnVision FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)**

**HercepTest™ mAb pharmDx**

**EnVision FLEX**

**Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

Fosfátový pufr obsahující peroxid vodíku, 15 mmol/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a detergent.

1 x 12 ml

**RABBIT ANTI-HUMAN  
HER2  
(Dako Omnis)**

**HercepTest™ mAb pharmDx**

**Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)**

Monoklonální protilátka připravená k použití, klon DG44. Dodává se 0,05 mol/l Tris/HCl, 0,1 mol/l NaCl, 15 mmol/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, obsahuje stabilizační roztok.

Imunogen: Syntetický C-terminální fragment (cytoplazmatická část) receptoru HER2.

Specifita: protein HER2. Způsob purifikace: Purifikace proteinu A.

1 x 22,5 ml

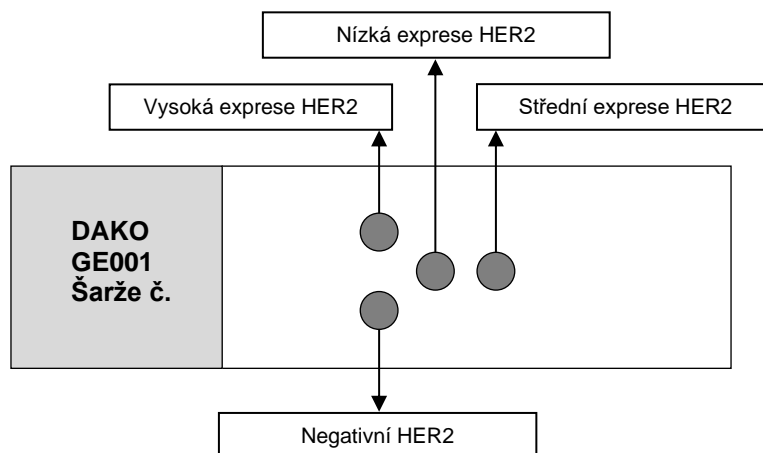
**VISUALIZATION  
REAGENT  
(Dako Omnis)**

**HercepTest™ mAb pharmDx**

**Visualization Reagent (Dako Omnis)**

Afinitně izolované molekuly koziho anti-králičího imunoglobulinu a molekuly křenové peroxidázy navázané na dextranový polymer. Dodává se v Tris-HCl pufru, který obsahuje stabilizující protein a antimikrobiální činidlo.

Množství	Popis
1 x 1 ml	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">EnVision FLEX DAB+ CHROMOGEN (Dako Omnis)</div> <p><b>HercepTest™ mAb pharmDx</b> <b>EnVision FLEX</b> <b>Chromogen DAB+ (Dako Omnis)</b> 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid v organickém rozpouštědle. Barva činidla může kolísat od silně fialové až po bezbarvou; rozdíly v barvě nemají žádný vliv na vizualizační reakci.</p>
2 x 26 ml	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">EnVision FLEX SUBSTRATE BUFFER (Dako Omnis)</div> <p><b>HercepTest™ mAb pharmDx</b> <b>EnVision FLEX</b> <b>Substrate Buffer (Dako Omnis)</b> Pufrový roztok s obsahem peroxidu vodíku a konzervačním činidlem.</p>
3 x 68 ml	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">EnVision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (50x) (Dako Omnis)</div> <p><b>HercepTest™ mAb pharmDx</b> <b>EnVision FLEX</b> <b>Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)</b> Citrátový pufr. Každá láhev obsahuje 68 ml činidla, 50x koncentrováno. Objem je optimalizován pro ředění v zásobních lahvích Dako Omnis.</p>
2 x 5 sklíček	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL SLIDES (Dako Omnis)</div> <p><b>HercepTest™ mAb pharmDx</b> <b>Control Slides (Dako Omnis)</b> Každé kontrolní sklíčko připravené k použití obsahuje čtyři linie lidských buněk karcinomu prsu FFPE (kontrolní buněčné linie) představující různé úrovně exprese proteínu HER2: MDA-231 (negativní, bez exprese HER2), MDA-175 (nízká exprese HER2), MDA-453 (střední exprese HER2) a SK-BR-3 (vysoká exprese HER2). Control Slides byla tepelně opracována, aby se zlepšila přilnavost vzorků ke sklům. Jakékoliv další tepelné ošetření Control Slides před testováním může ohrozit výsledky barvení.</p>



**POZNÁMKA:** Primární protilátka (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)), HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis) a HercepTest™ mAb pharmDx Control Slides (Dako Omnis) byly vytvořeny speciálně pro použití s tímto testem. Aby test odpovídal uvedené specifikaci, nelze používat žádné substituty těchto komponent. Tyto tři komponenty jsou vyhrazených šarží, což znamená, že tyto tři komponenty musí mít stejné číslo šarže. Možné substituty činidel pro zbývající komponenty soupravy jsou uvedeny níže v kapitole 7 Substituty komponent soupravy.

##### 5. Další potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Dako Omnis (kód G1100)  
 Promývací pufr Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (kód GC807)  
 Čerčící prostředek Clearify™ (Code GC810)  
 Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808 nebo ekvivalentní  
 Dako Omnis kyselina sírová, 0,3 M (kód GC203)  
 Mikroskopická sklíčka: mikroskopická sklíčka FLEX IHC (kód K8020) nebo Control Slides SuperFrost Plus  
 Destilovaná nebo deionizovaná voda (voda v kvalitě reagentie)  
 Sušička, schopná udržovat teplotu nejvýše 60 °C  
 Etanol  
 Mikroskop ve světlém poli (zvětšení objektivu 4–40x)  
 Materiály pro montování; doporučuje se trvalé montování, ale přijatelné je i dočasné montování  
 Pozitivní a negativní kontrolní tkáně (viz kapitola 13: Kontrola kvality)  
 Časovač  
 Xylen, toluen nebo substituty xylenů

## 6. Volitelné činidlo

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis), kód GA600, v tomto dokumentu označované jako Negative Control Reagent.

## 7. Substituty komponent soupravy

EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), lahvička DM841 (kód GV800/GV823/GV900)

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), lahvička DM849 (kód GV805).

EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), lahvička DM847 (kód GV800/GV823/GV825)

EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), lahvička DM843 (kód GV800/GV823/GV825/GV900/GV925)

## 8. Bezpečnostní opatření

- Pro diagnostiku in vitro.
- Určeno pro profesionální uživatele.
- Tento výrobek obsahuje azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ), který je v čisté formě vysoce toxický. Koncentrace azidu sodného v produktu není sice klasifikována jako nebezpečná, nicméně sloučenina může reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí.<sup>13</sup>
- HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis) a HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis) obsahují materiál živočišného původu. Jako u každého výrobku biologického původu je nutno dodržovat řádná bezpečnostní opatření.
- Činidla připravená k použití jsou optimálně naředěna. Další ředění může vést ke ztrátě barvení protilátky.
- S biologickými vzorky a biologickými vzorky před a po fixaci a se všemi ostatními materiály, které s nimi přijdou do styku, je nutno manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno je likvidovat s souladu s bezpečnostními opatřeními.<sup>14</sup> Nikdy nenabírejte reagentie do pipety ústy a zamezte kontaktu reagentií a vzorků s kůží a sliznicemi. Jestliže se činidla dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je dostatečným množstvím vody.
- Control Slides byla tepelně opracována, aby se zlepšila přilnavost vzorků ke sklům. Jakékoliv další tepelné ošetření Control Slides může ohrozit výsledky barvení.
- Nedodržení inkubační doby, objemu, teploty nebo metody může vést k chybným výsledkům. Nadměrné sušení sklíčků po dobu delší než jedna hodina při teplotě  $\geq 60^\circ\text{C}$  může způsobit výrazné snížení nebo ztrátu specifické imunoreaktivity související s HER2.<sup>15</sup>
- Jakákoliv odchylka od barvení a interpretace výsledků barvení (kapitola 14) a doporučení pro interpretaci (kapitola 15.2) může poskytnout chybné výsledky.
- Minimalizujte mikrobiální kontaminaci činidel, jinak by mohlo dojít k zvýšení nespecifického zabarvení.
- EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis), EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) a EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis) mohou být v případě vystavení působení intenzivního světla negativně ovlivněny. Neuchovávejte komponenty systému a neprovádějte barvení za silného světla, jako je například přímé sluneční světlo.
- Rezidua parafínu mohou vést k falešně negativním výsledkům.
- Používejte odpovídající osobní ochranné prostředky (PPE), aby nedošlo k zasažení očí nebo pokožky.
- Nespotřebované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.
- Obecně platí, že osoby mladší 18 let s tímto přípravkem nesmějí pracovat. Uživatelé musí být řádně proškoleni co se týče správného pracovního postupu, nebezpečných vlastností produktu a nutných bezpečnostních opatření. Další informace viz bezpečnostní list (Safety Data Sheet, SDS).
- Bezpečnostní datové listy jsou dostupné na vyžádání na stránkách [www.agilent.com](http://www.agilent.com).
- Činidlo HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis)** je označeno: Bezpečnostní datové listy jsou dostupné na vyžádání.
- Činidlo **EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)** je označeno: Bezpečnostní datové listy jsou dostupné na vyžádání.
- EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)** je označen:



### Rizika

Obsahuje 3,3-diaminobenzidín tetrahydrochlorid

H350	Může vyvolat rakovinu.
H341	Podezření na genetické poškození.
P201	Před použitím si obzarejte speciální instrukce.
P280	Používejte ochranné rukavice. Používejte ochranu očí a obličeje. Noste ochranný oděv.
P308 + P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařské ošetření.
P405	Skladujte uzamčené.
P501	Odstraňte obsah a obal v souladu se všemi místními, oblastními, národními a mezinárodními předpisy.

20. Pufr **EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)** je označen:



### Rizika

Obsahuje imidazol

H360	Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.
P201	Před použitím si obzarejte speciální instrukce.
P280	Používejte ochranné rukavice. Používejte ochranu očí a obličeje. Noste ochranný oděv.
P308 + P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařské ošetření.
P501	Odstraňte obsah a obal v souladu se všemi místními, oblastními, národními a mezinárodními předpisy.

## 21. EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) je označen:



<p>H319<sup>1</sup> H411 P280 P273 P264 P305 + P351 + P338  P337 + P313 P501</p>	<p><b><sup>1</sup>Varování</b> Způsobuje vážné podráždění očí. Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Používejte ochranu očí a obličeje. Zabraňte úniku do životního prostředí. Po manipulaci si důkladně omyjte ruce. <b>PŘI ZASAŽENÍ OČÍ:</b> Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyměňte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařské ošetření. Odstraňte obsah a obal v souladu se všemi místními, oblastními, národními a mezinárodními předpisy.</p>
--	--

Obsahuje 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxan. Může způsobit alergické reakce.

<sup>1</sup>Piktogram rizika GHS07 (varování) a H319 nejsou relevantní pro všechny regiony. Viz bezpečnostní datový list na adrese on www.agilent.com

## 9. Uchovávání

Všechny komponenty HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis), pokud je nepoužíváte s přístrojem Dako Omnis, skladujte při teplotě 2–8 °C. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), Visualization Reagent (Dako Omnis), EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis) a EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) skladujte v temnu. Během skladování by měla být víčka na jednotlivých lahvíčkách uzavřená. Control Slides skladujte při teplotě 2–8 °C.

**Nepoužívejte soupravu po datu expirace vytištěném na vnější straně obalu.** Pokud se reagentie skladují za jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny v pokynech k použití, musí uživatel provést jejich kontrolu.

Ověřená aplikační stabilita činidel HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) k okamžitému použití činí 240 hodin. Po dokončení barvení je třeba reagentie z Dako Omnis vyjmout, bezpečně vyměnit uzávěry na lahvíčkách a skladovat je v temnu při teplotě 2–8 °C. Aplikační stabilita zředěných pracovních roztoků Wash Buffer (Dako Omnis) a EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) je 7 dní. Doba aplikační stability je kontrolována softwarem Dako Omnis, pro více informací viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

**POZNÁMKA:** Případné nesprávné skladování nebo manipulace s výrobkem se během doby použitelnosti výrobku neprojevuje žádnými známkami. Pozitivní a negativní kontrolní tkáň je nutno provádět současně se vzorky pacienta, nejlépe na stejném sklíčku jako tkáň pacienta, a to pro účely monitorování výkonnosti výrobku během jeho doby použitelnosti. Existuje-li podezření na problém s produktem během doby použitelnosti, které nelze vysvětlit nesprávným skladováním výrobku či manipulací s ním, ani jinými odchylkami v laboratorních postupech, kontaktujte patologickou podporu společnosti Agilent. Více informací viz kapitola 19: Řešení problémů a kapitola 13: Kontrola kvality.

**POZNÁMKA:** Pro ověření výkonu činidel vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) v cyklu použijte dodané HercepTest™ mAb pharmDx Control Slide (Dako Omnis) vždy, když se do přístroje Dako Omnis vloží nebo opětovně vloží činidla vyhrazených šarží.

## 10. Příprava vzorku

Se vzorky se musí manipulovat tak, aby tkáň pro IHC barvení zůstala chráněna. Všechny vzorky tkání by se měly zpracovávat podle standardních metod.<sup>16</sup> Všeobecné informace o přípravě vzorků naleznete v příručce pro vzdělávání Dako: Immunohistochemical Staining Methods.<sup>17</sup>

## 10.1 Řezy zalité v parafínu

K použití jsou vhodné tkáně FFPE. Alternativní fixativa nebyla validována a mohou vést k nesprávným výsledkům. V neutrálním pufovaném formalínu (NBF) doporučujeme fixační dobu 6–48 hodin. Vzorky by měly mít tloušťku 3 nebo 4 mm, měly by být fixované ve formalínu, dehydrované a vyčištěné v sérii alkoholů a xylenu, po kterém následuje infiltrace s roztaveným parafínem. Teplota parafínu by neměla překročit 60 °C. Pro fixační doby mimo rozmezí 6–48 hodin musí uživatel provést kontrolu. Použití testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) u odvápněných tkání dosud nebylo ověřeno a nedoporučuje se.

## 10.2 Tkáňové řezy

Vzorky tkání FFPE je nutno rozřezat na řezy o tloušťce 3–5 µm. Po vytvoření řezů by tkáň měla být připevněna na mikroskopická sklíčka FLEX IHC (kód K8020) nebo sklíčka SuperFrost Plus a po dobu na 1 hodiny sušena při teplotě 60 °C.

**UPOZORNĚNÍ:** Nadměrné zahřívání po dobu > 1 hodiny při teplotě ≥60 °C může způsobit výrazné snížení nebo ztrátu specifické imunoreaktivity související s HER2.<sup>15</sup>

Chcete-li zachovat antigenicitu, měly by se tkáňové řezy umístěné na sklíčka obarvit do 8 týdnů od provedení řezů, pokud jsou uchovávány v temnu při teplotě 2–8 °C (preferováno) nebo při pokojové teplotě do 25 °C. Teplota při skladování nebo manipulaci by nikdy neměla překročit 25 °C, a to v žádném okamžiku po umístění na sklíčka, aby se zajistila integrita a antigenicita tkáně. Podložní skla požadovaná pro vyhodnocení proteinu HER2 a ověření přítomnosti nádoru se musí připravovat současně.

Vzorky tkáně je nutno namontovat na sklíčko do definované oblasti zabarvení sklíčka. Rozměry oblasti zabarvení sklíčka naleznete v základní uživatelské příručce Dako Omnis.

## 11. Příprava reagentie

Uživatel musí dodržovat příslušné požadavky PPE a před použitím se seznámit se všemi součástmi (viz kapitola 8: Bezpečnostní opatření).

Před barvením se doporučuje připravit pracovní roztoky následujících reagentie:

**EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) (kód GE001).**

Připravte si dostatečné množství 1x Target Retrieval Solution, Low pH, a to tak, že EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) zředíte destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1 : 50.

1. Zásobní láhev Dako Omnis 3,5 l, na světle modrém štítku označenou PTB, po rysku naplňte destilovanou nebo deionizovanou vodou (3,325 l). Dbejte, aby zásobní láhev před plněním stála na vodorovném povrchu.
2. Nalijte do zásobní lahve jednu lahvičku koncentrátu 68 ml EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis).
3. Přeplepte snímatelný štítek z lahvičky koncentrátu na zásobní láhev. Připevněte víčko zásobní lahve a opatrně láhev 2-3krát obraťte.
4. Pomocí ruční čtečky čárových kódů Dako Omnis identifikujte činidlo (načtete snímatelný štítek a poté zásobní láhev).

- Zásobní láhev vložte do přístroje Dako Omnis. Další informace týkající se plnění a registrace činidla v přístroji Dako Omnis naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Naředěný roztok by se měl použít do 7 dnů, je-li uložen v přístroji Dako Omnis. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Nepoužitý naředěný roztok lze skladovat jeden měsíc při 2-8 °C. Pokud se činidla skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Po skladování v chladničce dbejte, aby byl naředěný roztok vyvážen na teplotu nejméně 18 °C a teprve poté vložen do přístroje Dako Omnis.

**POZNÁMKA:** Naředěný roztok zlikvidujte, pokud je zakalený.

#### Průmyvací pufr Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (kód GC807)

Zředěním pufru Wash Buffer destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1 : 20 si připravte dostatečné množství pufru Wash Buffer pro mytí.

- Zásobní láhev Dako Omnis 3,5 l, na zeleném štítku označenou WB, po rýsku naplňte destilovanou nebo deionizovanou vodou (3,325 l). Dbejte, aby zásobní láhev před plněním stála na vodorovném povrchu.
- Nalijte do zásobní lahve jednu lahvičku koncentrátu 175 mL Wash Buffer (20x) (Dako Omnis).
- Přelepte snímatelný štítek z lahvičky koncentrátu na zásobní láhev. Připevněte víčko zásobní lahve a opatrně láhev 2-3krát obraťte.
- Pomocí ruční čtečky čárových kódů Dako Omnis identifikujte činidlo (načtete snímatelný štítek a poté zásobní láhev).
- Zásobní láhev vložte do přístroje Dako Omnis. Další informace týkající se plnění a registrace činidla v přístroji Dako Omnis naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Naředěný roztok by se měl použít do 7 dnů, je-li uložen v přístroji Dako Omnis. Aplikační stabilitu sleduje software Dako Omnis. Nepoužitý naředěný roztok lze skladovat jeden měsíc při 2-8 °C. Pokud se činidla skladují za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek, musí uživatel tyto podmínky ověřit. Po skladování v chladničce dbejte, aby byl naředěný roztok vyvážen na teplotu nejméně 18 °C a teprve poté vložen do přístroje Dako Omnis.

**POZNÁMKA:** Naředěný roztok zlikvidujte, pokud je zakalený.

#### EnVision FLEX Substrate Working Solution

Roztok EnVision FLEX Substrate Working Solution s obsahem DAB se připravuje v přístroji Dako Omnis. Automatizovaný proces smíchá jeden díl přípravku EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) s 50 díly pufru EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis). Pracovní substrátový roztok se vždy připravuje pro jeden stojan (s 1-5 sklíčky) najednou.

## 12. Postup barvení přístrojem Dako Omnis

### 12.1 Poznámky k postupu

Uživatel by si měl tyto pokyny pozorně přečíst a před použitím se seznámit se všemi součástmi a nástroji (viz kapitola 8: Bezpečnostní opatření).

Automatizovaný postup barvení pro HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) zahrnuje odparafinování tkáňových řezů, odmaskování a barvení. Sklíčka se vyjmají ve vlhkém výstupním zásobníku. Všechny kroky protokolu jsou předem naprogramovány v softwaru Dako Omnis. Protokol „HercepTest™ mAb pharmDx“ se používá s primární protilátkou (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)), volitelné Negative Control Reagent FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis) (kód GA600) se používá s protokolem „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent“. Další informace o vkládání podložních skel a plnění činidel naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

Reagencie a návody dodané v této soupravě byly navrženy pro optimální účinnost. Další ředění činidel nebo změna protokolu barvení může vést k nesprávným nebo nesouhlasným výsledkům. Rozdíly v zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou znehodnotit výsledky studie.

**POZNÁMKA:** Laboratoře umístěné ve vyšších nadmořských výškách musí během odmaskování epitopu stanovit optimální metodu udržování potřebné teploty (95–99 °C). Uživatel musí vyhodnotit jakékoli úpravy vyžadované pro řešení problémů týkajících se nadmořské výšky .

### 12.2 Postup před barvením

- Pro každý snímek ze softwaru Dako Link Omnis Workstation vyberte, zda bude použit protokol HercepTest™ mAb pharmDx nebo Negative Control Reagent (volitelné).
- Zkontrolujte, že je software Dako Link Omnis Workstation nakonfigurován na tisk štítků sklíček s uvedeným názvem protokolu.
- Vytiskněte štítky sklíček a připevněte je ke sklíčkům.
- Ujistěte se, že kontrolní sklíčko (Dako Omnis) je ze stejné šarže jako činidla vyhrazených šarží; Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis) a Visualization Reagent (Dako Omnis).
- Vložte sklíčka do stojanu na sklíčka. Do stojanu na sklíčka lze vložit jedno až pět sklíček.
- Ujistěte se, že jsou v přístroji Dako Omnis vloženy a zaregistrovány láhve se zásobními tekutinami:
  - Clarify™ (kód GC810)
  - EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low Ph, kód GE001 nebo DM849 (kód GV805) zředěný destilovanou nebo deionizovanou vodou na 1x pracovní roztok
  - Wash buffer, kód GC807, zředěný destilovanou nebo deionizovanou vodou na 1x pracovní roztok
- Před vložením všech požadovaných reagentů do modulu pro uchování reagentů se ujistěte, že jsou všechna víčka lahviček s otočným krytem otevřená a zajištěná na svém místě:
  - EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), kód GE001 nebo lahvička DM841 (kód GV800/GV823/GV900)
  - Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis), kód GE001
  - Visualization Reagent (Dako Omnis), kód GE001
  - EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), kód GE001 nebo lahvička DM843 (kód GV800/GV823/GV825/GV900/GV925)
  - EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), kód GE001 nebo lahvička DM847 (kód GV800/GV823/GV825)
  - Hematoxylin (Dako Omnis), kód GC808 nebo ekvivalentní
  - Volitelné: FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis), kód GA600
  - Dako Omnis kyselina sírová, 0,3 M, kód GC203
- Vložte stojan na sklíčka do přístroje Dako Omnis.
- Postupujte podle pokynů na dotykové obrazovce a klepnutím na možnost „Done“ (Hotovo) spustíte postup barvení.
- Zkontrolujte, zda je posuvný výstupní zásobník naplněn destilovanou nebo deionizovanou vodou, aby se sklíčka nevysušila.

**POZNÁMKA:** Dako Omnis automaticky přiřadí vloženým sklíčkům dříve použité číslo šarže HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis), nedosáhla-li tato šarže expirace nebo není-li prázdná. Chcete-li použít jinou šarži před uplynutím data expirace nebo vyprázdněním dříve použité šarže, musí se pro každé sklíčko číslo nové šarže vybrat ručně. Ujistěte se, že se číslo nové šarže vybrané pro Control Slides shodují s číslem šarže natištěným na štítku Control Slides a shoduje se činidly, která se mají použít (primární protilátka a vizualizační činidlo). Technické podrobnosti naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis.

### 12.3 Protokol barvení

Protokoly „HercepTest™ mAb pharmDx“ a „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent“ na přístroji Dako Omnis lze monitorovat na pracovní stanici Dako Link Omnis Workstation.

Sklička by měla být kontrastně podbarvována hematoxylinem (Dako Omnis), kód GC808 nebo ekvivalentní. Protokol HercepTest™ mAb pharmDx na přístroji Dako Omnis zahrnuje krok kontrastního podbarvení, který může uživatel upravovat. Pokud se upřednostňují jiná kontrastní podbarvení, než ta, která se doporučují, mohou se použít, jsou-li potvrzena uživatelem. Další informace o úpravě protokolů naleznete v Příručce pro pokročilé uživatele Dako Omnis.

### 12.4 Postup po barvení

Nedopustte, aby řezy před montováním uschly. Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis se řezy musí dehydratovat, vyčistit a namontovat. Doporučují se nevodné, permanentní metody montování. Vodní montáž je však také přípustná.

**POZNÁMKA:** Podložní skla lze čist, kdykoli je to vhodné. Pokud jsou však podložní skla zakryta vodným montovacím médiem a/nebo vystavena světlu, může dojít k vyblednutí.

## 13. Kontrola kvality

Odchyly od doporučených postupů pro fixaci tkání, zpracování a zalití mohou vést ke značné variabilitě výsledků získaných v laboratoři uživatele. Kontroly kvality jsou popsány níže a zahrnují: laboratoří dodané pozitivní a negativní kontrolní tkáně a kontrolní skličko. Prostudujte si zásady kontroly kvality patologů z College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry (certifikační program pro imunohistochemii), další informace viz též zajištění kvality CLSI pro imunocytochemii, schválené pokyny, druhé vydání<sup>18</sup>.

### 13.1 Kontrolní skličko (dodané), je třeba ho použít při každém vložení nebo opětovném vložení činidel vyhrazených šarží do přístroje Dako Omnis

Každé dodané Control Slides připravené k použití (Dako Omnis) obsahuje čtyři peletované linie lidských buněk karcinomu prsu FFPE se čtyřmi různými úrovněmi exprese proteinu HER2, a tedy úrovněmi intenzity barvení. Tyto čtyři buněčné linie zobrazují různé úrovně intenzity zabarvení HER2, tj. žádné zabarvení HER2 (negativní), nízkou, střední a vysokou intenzitu zabarvení HER2. Jedno skličko by se mělo zabarvit v prvním cyklu po vložení nebo opětovném vložení činidel vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) do přístroje Dako Omnis. Vyhodnocení dodaného kontrolního sklička ověřuje pouze výkon činidla a neověřuje přípravu tkáně. Další informace o programování Control Slides naleznete v Základní uživatelské příručce Dako Omnis

### 13.2 Tkáň pro pozitivní kontrolu

Tkáň pro pozitivní kontrolu by měla zahrnovat biopticky nebo chirurgicky odebrané vzorky, fixované, zpracované a zalité stejným způsobem jako vzorky pacienta. Pozitivní kontrolní tkáně indikují správně připravené tkáně, správnou techniku barvení a výkon činidel. Vzorky zpracované jinak než patientské vzorky ověřují výkon činidel a neověřují přípravu tkáně. Doporučujeme, aby pozitivní kontrolní tkáň byla barveny na stejném skličku jako tkáň pacienta. Pozitivní kontrola by měla být slabě pozitivně zabarvená, aby pomohla detekovat nepatrné změny citlivosti primární protilátky (Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)). Pro ideální tkáň pro pozitivní kontrolu použijte dříve zjištěný protein HER2, 2+ hyperexprimující invazivní (infiltrující) lidskou tkáň karcinomu prsu.

**POZNÁMKA:** Známé tkáně pro pozitivní kontrolu by měly být používány pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a reagentů, NIKOLIV jako pomůcka k formulaci specifické diagnózy vzorků pacienta. Pokud se v pozitivních kontrolních tkáních neprojeví příslušné pozitivní zabarvení, je nutno považovat výsledky patientských vzorků za neplatné a test se musí zopakovat.

### 13.3 Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu by měla zahrnovat biopticky nebo chirurgicky odebrané vzorky, fixované, zpracované a zalité stejným způsobem jako vzorky pacienta. Tkáň pro negativní kontrolu by se měla použít k ověření specifity primární protilátky (Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)) a k poskytnutí informací o zabarvení pozadí. Doporučujeme, aby se negativní kontrola barvila na stejném snímku jako tkáň pacienta. Negativní kontrola by měla být tkáň, o které se ví, že nemá expresi proteinu HER2, potencionální tkáně pro negativní kontrolu viz tabulka 4. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řezů tkání, nabízí vnitřní struktury pro negativní kontrolu, které by měl ověřit uživatel. Pokud se v tkáni pro negativní kontrolu nebo ve vnitřních strukturách negativní kontroly objeví specifické zabarvení membrány, je nutné výsledky patientských vzorků považovat za neplatné a test se musí zopakovat.

### 13.4 Nespecifické Negative Control Reagent (volitelné)

Pro ověření nespecifického zabarvení a lepší interpretaci specifického zabarvení v místě protilátky se může s patientským vzorkem místo primární protilátky použít Negative Control Reagent, FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis) (kód GA600). V případě skliček barvených činidlem pro negativní kontrolu použijte protokol Dako Omnis „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent“.

### 13.5 Ověření stanovení

Před prvním použitím barvicího systému v rámci diagnostického postupu by měl uživatel ověřit provedení rozboru tak, že jej otestuje na sérii laboratoří dodaných pozitivních a negativních tkáních se známými IHC charakteristikami. Další informace viz výše uvedené postupy kontroly kvality a požadavky na kontrolu kvality CAP Certification Program for Immunohistochemistry (certifikační program pro imunohistochemii), a/nebo Zajištění kvality CLSI pro imunocytochemii, schválené pokyny<sup>18</sup>. Pro ověření testu jsou vhodné karcinomy prsu se známými intenzitami zabarvení proteinu HER2 od 0–3+ a negativní tkáně (viz tabulka 4). Tyto postupy kontroly kvality by se měly opakovat vždy, když dojde ke změně v testovacích parametrech. Možnosti řešení potenciálních problémů, jejich příčiny a navrhovaná nápravná opatření jsou uvedeny v tabulce 10.

## 14. Barvení a interpretace výsledků barvení

Pro stanovení hyperexprese proteinu HER2 by se měly vyhodnocovat intenzita a vzor pouze *membránového* zabarvení pomocí škály uvedené v tabulce 1. Sklička by měl vyhodnotit patolog za použití mikroskopu ve světlem poli. Pro vyhodnocení imunohistochemického barvení a jeho hodnocení je vhodné zvětšení objektivu 10x. Použití zvětšení objektivu 20–40x se doporučuje pro potvrzení skóre. Cytoplazmatické zabarvení by se mělo považovat za nespecifické zabarvení a nemělo by být zahrnováno do hodnocení intenzity membránového zabarvení.<sup>3</sup> Pomoc s rozlišením zabarvení 0, 1+, 2+ a 3+ viz „Příručka interpretací HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) – rakovina prsu“, kde jsou uvedeny příklady intenzity zabarvení, a kapitola 15.2, kde jsou uvedena další doporučení pro interpretaci zabarvení HercepTest™ mAb pharmDx.

Hodnoceny by měly být pouze vzorky pacientů s karcinomem prsu. V případě výskytu karcinomu *in situ* a invazivního karcinomu ve stejném vzorku se hodnotí pouze invazivní komponenta.



Tabulka 1: Kritéria intenzity barvení buněčné membrány

Barvicí vzor	Skóre (Hlášení ošetřujícímu lékaři)	Hodnocení exprese proteinu HER2 (Hlášení ošetřujícímu lékaři)
Nebylo pozorováno žádné zbarvení nebo bylo pozorováno membránové zbarvení u méně než 10 % nádorových buněk	0	negativní
Nejasné / sotva znatelné membránové zbarvení bylo zjištěno ve více než 10% nádorových buněk. Buňky byly zbarveny pouze na části své membrány	1+	negativní
Slabé až střední úplné membránové zbarvení bylo pozorováno ve více než 10% nádorových buněk	2+	Slabě pozitivní
Silné úplné membránové zbarvení bylo pozorováno ve více než 10% nádorových buněk	3+	Silně pozitivní

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) se interpretuje pro hyperexpresi proteinu HER2 jako negativní (intenzita zbarvení 0 a 1+), slabě pozitivní (intenzita zbarvení 2+) a silně pozitivní (intenzita zbarvení 3+). HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) není vhodný k poskytování informací o prognóze pacientovi a lékaři a nebyl pro tento účel ověřen.

## 15. Hodnocení tkáně

Aby byl postup barvení platný a aby bylo možno uskutečnit semikvantitativní zkoušku intenzity zbarvení tkáně pacienta, je třeba podložní skla testovat v níže uvedeném pořadí. Podrobnosti viz tabulka 2.

1. Barvení vzorku tkáně hematoxylinem a eosinem (H&E)
2. Kontrolní sklíčko obsahující čtyři buněčné linie – **zahrnuté pouze v prvním cyklu po vložení nebo opětovném vložení činidel vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) do přístroje Dako Omnis**
3. Tkáň pro pozitivní kontrolu
4. Tkáň pro negativní kontrolu
5. Tkáň pacienta obarvená činidlem pro negativní kontrolu (**volitelné**)
6. Tkáň pacienta obarvená primární protilátkou (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis))

Tabulka 2: Doporučené pořadí hodnocení tkání

Vzorky	Zdůvodnění	Požadavky na vyhodnocení
1. Tkáň pacienta obarvená pomocí H&E	Barvení tkáně pacienta H&E se hodnotí jako první pro posouzení histologické a konzervační kvality tkáně.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) a barvení H&amp;E by se měly provádět na sériových řezech ze stejného parafinového bločku vzorku.</li> <li>• Tkáňové vzorky by měly být neporušené, dobře zachovalé a měly by potvrdit indikaci nádoru.</li> </ul>
2. Kontrolní sklíčko (Dodáváno se soupravou)	Mělo by se vyšetřit kontrolní sklíčko, aby se ověřilo správné působení činidel vyhrazených šarží.  Viz kapitola 15.1: Hodnocení Control Slides.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mělo by se zahrnout pouze do prvního cyklu po vložení nebo opětovném vložení činidel vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) do přístroje Dako Omnis.</li> </ul>
3. Tkáň pro pozitivní kontrolu (dodaná laboratoři)	Dále by se měla otestovat slabě pozitivní (2+) kontrolní tkáň. Tato kontrola ověřuje metodu fixace, techniku barvení a výkon činidla.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• K interpretaci výsledků použijte neporušené buňky, protože nekrotické a degenerované buňky se často zbarvují nespecificky.<sup>19</sup></li> <li>• Nádorová tkáň by měla vykazovat hnědé zbarvení membrány. Zbarvení cytoplazmy a negativních struktur vzorku by nemělo být silnější než skóre intenzity zbarvení 1+.</li> <li>• Pokud se ve tkáni pro pozitivní kontrolu neprojeví příslušné pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky pacientových vzorků za neplatné.</li> </ul>
4. Tkáň pro negativní kontrolu (dodaná laboratoři)	Tkáň pro negativní kontrolu je nutno otestovat po tkáni pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specificitu značení cílového antigenu primární protilátkou.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nepřítomnost zbarvení membrány v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost křížové reaktivity sady s buňkami / částmi buněk. Negativní podíly tkání pro pozitivní kontrolu mohou být také použity jako tkáň pro negativní kontrolu, ale toto musí být uživatelem ověřeno.</li> <li>• Ve většině normální epiteliálních tkání lze pozorovat velmi slabou reakci.<sup>3, 20, 21</sup> Potencionální tkáň pro negativní kontrolu viz tabulka 4.</li> <li>• Pokud se vyskytne nespecifické zbarvení, bude difúzní. Sporadické zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání příliš fixovaných formalínem.</li> <li>• Pokud na tkáních pro negativní kontrolu dojde ke specifickému zbarvení (falešnému pozitivnímu zbarvení), budou výsledky tkání pacienta považovány za neplatné.</li> </ul>

Vzorky	Zdůvodnění	Požadavky na vyhodnocení
5. <b>Volitelné:</b> Tkáň pacienta obarvená činidlem pro negativní kontrolu  (dodaná laboratoří)	Nepřítomnost membránového zbarvení potvrzuje specifické značení cílového antigenu primární protilátkou.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hnědé zbarvení cytoplazmy vzorku obarveného činidlem pro negativní kontrolu, například pojivové tkáně, leukocytů, erytrocytů či nekrotické tkáně, by se mělo považovat za nespecifické zbarvení pozadí.</li> </ul>
6. Tkáň pacienta  (dodaná laboratoří)	Naposledy otestujte vzorky pacientů obarvené HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) a vyhodnoťte tak stav proteinu HER2.  Podrobnosti o hodnocení tkáně pacientů viz <b>kapitola 14</b> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Jako u každého imunohistochemického testu negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách / tkáni přítomen.</li> <li>Konkrétní informace ohledně imunoreaktivity HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) viz Souhrn a výklad, Omezení a Charakteristiky účinnosti.</li> <li>Reflexní testování se doporučuje v případě nejasných / slabě pozitivních výsledků podle pokynů ASCO/CAP.<sup>22</sup></li> </ul>

### 15.1 Hodnocení kontrolního sklíčka (dodávané)

Mělo by se otestovat kontrolní sklíčko (kontrolní sklíčka s buňkami) obarvené HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis), aby se ověřilo, že činidla vyhrazených šarží (primární protilátka a vizualizační činidlo) fungují po vložení nebo po opětovném vložení do přístroje Dako Omnis správně. Přítomnost hnědé barvicí reakce na membráně buňky indikuje pozitivní reaktivitu.

Ověřte, že intenzita zbarvení čtyř kontrolních buněčných linií od žádné exprese HER2 (žádné zbarvení, negativní) až po buněčnou linii s vysokou expresí proteinu HER2 (vysoká intenzita zbarvení) vykazuje postupné zvyšování intenzity zbarvení mezi čtyřmi různými kontrolními buněčnými liniemi. Poté podle tabulky 3 vyhodnoťte jednotlivé kontrolní buněčné linie.

**Tabulka 3: Barvicí vzor HercepTest™ mAb pharmDx Control Slides (Dako Omnis)**

Úroveň intenzity zbarvení	Úroveň exprese proteinu HER2
Žádné barvení	Negativní Žádná exprese proteinu HER2
Slabé až střední hnědé částečné zbarvení buněčné membrány*	Nízká exprese proteinu HER2
Střední až silné hnědé zbarvení celé buněčné membrány	Střední exprese proteinu HER2
Silné hnědé zbarvení celé buněčné membrány	Vysoká exprese proteinu HER2

\*Určité výjimky barvicího vzoru lze pozorovat u kontrolní buněčné linie s nízkou expresí (nízká): 1) Lze pozorovat tečkované imunologické barvení oblasti Golgiho aparátu. 2) Může být přítomno málo buněk se zbarvením celé buněčné membrány.

Pokud jakékoliv kontrolní buněčné linie na kontrolním sklíčku barví mimo tato kritéria, měla by se činidla vyhrazených šarží použít v cyklu zlikvidovat a sklíčka obarvená těmito činidly by se měla považovat za neplatná. Zlikvidovat by se měla sklíčka obarvená po vložení / opětovném vložení činidel, která vedla k neschváleným Control Slides.

### 15.2 Další doporučení pro interpretaci barvení HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis)

Většina karcinomů prsu testovaných na hyperexpresi proteinu HER2 dávala skóre 0 nebo 3+. Zatímco většina těchto případů je zcela jasných, malé procento vzorků s intenzitou 1+ a 2+ se může zdát těžko interpretovatelné.

**POZNÁMKA:** Vizuální kontrast mezi kontrastním podbarvením DAB a hematoxylinem může ovlivnit vnímání intenzity zbarvení membrány, proto je důležité se řídit doporučenými pokyny pro interpretaci. Reprezentativní příklady viz „Příručka interpretací HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) – rakovina prsu“

K interpretaci zbarvení HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) ve vaší laboratoři použijte následující dodatečné pokyny.

- Nejprve zhodnoťte tkáň pacienta obarvenou pro expresi proteinu HER2 při nízkém zvětšení (10x). Většina pozitivních případů bude zřetelná již při malém zvětšení.
- Ke stanovení procenta pozitivních nádorových buněk je třeba použít dobře uchovávané a barvené oblasti vzorku.
- K ověření přítomnosti membránového zbarvení použijte zvětšení objektivu 20–40x.
- Jestliže více než 10 % nádorových buněk vykazuje úplné membránové zbarvení, je skóre barvení 2+ nebo 3+. K potvrzení skóre použijte zvětšení objektivu 20–40x. Je-li většina případů 3+, je nejméně 80 % nádorových buněk zbarveno a membránové zbarvení je silné a kompletní.
- Je-li vzorek blízko mezní hodnotě 10 % pozitivních nádorových buněk, doporučuje se ke stanovení procentuální hodnoty zbarvených buněk počítat minimálně 100 nádorových buněk.
- Je-li úplné membránové zbarvení slabé až střední intenzity ve více než 10 % nádorových buněk, je skóre vzorku 2+. To je obvykle průvodním jevem u neúplného membránového zbarvení většiny zbývajících nádorových buněk.
- Jestliže méně než 10 % nádorových buněk vykazuje úplné membránové zbarvení, ačkoliv ostatní nádorové buňky mohou mít neúplné membránové zbarvení, skóre je 1+.
- Skóre 0 je definováno, jestliže má méně než 10 % nádorových buněk úplné nebo neúplné zbarvení membrány.

## 16. Omezení

### 16.1 Všeobecná omezení

- Imunohistochemie je vícekrokový diagnostický postup, který vyžaduje specializované zaškolení ve výběru vhodných činidel a tkáně, fixaci a zpracování; přípravě imunohistochemických sklíčků a interpretaci výsledků barvení.
- Barvení tkání závisí na manipulaci a zpracování tkáně před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazování, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může způsobovat artefakty, zachycení protilátky nebo falešné negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou vzniknout kvůli odchylkám v metodách fixace a zalití nebo v důsledku skrytých nepravidlostí tkání.
- Nadměrné nebo neúplné kontrastní podbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

- Klinická interpretace pozitivního barvení, nebo jeho nepřítomnosti, musí být vyhodnocena v kontextu klinických projevů, morfologie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli barvení, nebo jeho nepřítomnosti, musí být doplněna morfologickými studii, řádnými kontrolami a dalšími diagnostickými testy. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protilátky, činidla a použité metody. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem kvalifikovaného patologa zodpovědného za hodnocení barvených sklíček a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg), mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zabarvení.<sup>23</sup>
- Činidla mohou u dříve neošetřených typů tkání vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávané reakce nemůže být vyloučena ani u testovaných typů tkání, a to v důsledku biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních.<sup>24</sup> Pokud zdokumentujete neočekávané reakce, kontaktujte patologickou podporu společnosti Agilent.
- Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být obarveny v souladu s doporučeními k uchování tkáňových řezů (viz kapitola 10: Příprava vzorku).<sup>17</sup>
- Činidla a návody dodané pro tento test byly navrženy pro optimální účinnost. Další ředění činidel nebo pozměnění časů inkubace nebo teplot může vést k chybným nebo nesouhlasným výsledkům.
- Sklička označená v protokolu sklička na pracovní stanici Dako Link Omnis Workstation by měl prošetřit kvalifikovaný personál. Viz Základní uživatelská příručka a Příručka pro pokročilé uživatele Dako Omnis Basic.
- Zrušená sklička označují, že se během barvení vyskytl významný problém a skličko by nemělo být použito. U vzorku bude nutné provést opakované barvení. Další podrobnosti naleznete v Příručce pro pokročilé uživatele Dako Omnis.

## 16.2 Omezení specifická pro tento produkt

- Protilátka přítomná v kontrolní buněčné linii s nízkou expresí proteinu HER2 podléhá v průběhu času degradaci. Výsledky Control Slides posuzujte s odkazem na datum expirace Control Slides. Nedostatečné zabarvení buněk kontrolních buněčných linií s nízkou expresí proteinu HER2 může pouze označovat, že kontrolní skličko degradovalo.
- Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny degradací antigenu v tkáních, ke které může po určité době docházet. Vzorky by měly být obarveny v souladu s doporučeními k uchování tkáňových řezů (viz kapitola 10: Příprava vzorku).
- Činidla: primární protilátka, vizualizační činidlo a Control Slides v soupravě nenahrazujte jinými činidly s jinými čísly šarže.
- Z hodnocení cytoplazmatického zabarvení by se mohly získat falešně negativní výsledky. Při interpretaci výsledků posuzujte pouze intenzitu membránového zabarvení.
- Barvená Control Slides se musí používat pouze k ověření výkonu činidel vyhrazených šarží a *nesmí* se používat k hodnocení reakce barvení v tkáňových řezech.
- Občas lze pozorovat silné fokální zabarvení (3+), tj. „aktivní body“. Doporučuje se imunologické barvení druhého tkáňového bloku ze stejného vzorku.
- Použití testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na vzorcích fixovaných jinými fixačními prostředky než neutrálním pufovaným formalinem dosud nebylo ověřeno.
- Slabé zabarvení normálního epitelu v prsní tkáni je přijatelné. Je-li pozorováno silné zabarvení normálního epitelu, je třeba test zopakovat.

## 17. Charakteristiky účinnosti

### 17.1 Analytická citlivost

Analytická citlivost HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) byla testována na vzorcích FFPE s karcinomem prsu s expresí HER2 v rozmezí 0–3+. Vyhodnocení exprese HER2 napříč sériového ředění primární protilátky ukázalo korelaci mezi koncentrací protilátky a intenzitou barvení specifickou pro HER2.

### 17.2 Analytická specifická

**Normální tkáň:** V tabulce 4 je uveden souhrnný přehled imunoreaktivity testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na doporučeném panelu normálních tkání obarvených podle pokynů v tomto příbalovém letáku. Na membráně a v cytoplazmě řady epitelálních buněk bylo pozorováno velmi slabé nebo téměř žádné zabarvení HER2.

**Tabulka 4: Souhrn reaktivity normální tkáně v testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis). Procento (%) představuje frakci pozitivních buněk**

Typ tkáně (Počet testovaných)	Pozitivní membránové zabarvení; prvky tkáně (intenzita a % buněk)	Pozitivní cytoplazmatické zabarvení; prvky tkáně (intenzita a % buněk)	Nespecifické zabarvení
Brzlík (3)	2/3 Retikulární buňky a Hassalova tělíska (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 50 %)	0/3	0/3
Děloha (3)	2/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 10 %)	0/3	0/3
Děložní hrdlo (3)	3/3 Glandulární epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 5–10 %)	0/3	0/3
Hypofýza (3)	0/3	0/3	0/3
Játra (3)	0/3	2/3 Hepatocyty (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 2–5 %)	0/3
Jícen (3)	1/3 Epiteliální buňky srdeční komory (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 10 %)	0/3	0/3
	2/3 Skvamózní epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 20 %)		
Kosterní sval (3)	0/3	0/3	0/3
Kostní dřevina (3)	0/3	1/3 Myeloidní prekurzory (slabé až střední zabarvení, <1 %)	0/3
Kůže (3)	3/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 40–60 %)	0/3	0/3
Ledvina (3)	3/3 Tubulární epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 2–10 %)	3/3 Tubulární epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 2–10 %)	0/3
Malý mozek (3)	0/3	0/3	0/3
Mandle (3)	3/3 Skvamózní epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 10–30 %)	3/3 Skvamózní epitelální buňky (velmi slabé / téměř žádné zabarvení, 10–30 %)	0/3
Mezotel (3)	0/3	0/3	0/3
Mozek (3)	0/3	0/3	0/3
Nadledvina (3)	0/3	0/3	0/3

Typ tkáně (Počet testovaných)	Positivní membránové zbarvení; prvky tkáně (intenzita a % buněk)	Positivní cytoplazmatické zbarvení; prvky tkáně (intenzita a % buněk)	Nespecifické zbarvení
Nerv periferní (3)	0/3	1/3 Neuronové buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 1 %)	0/3
Pankreas (3)	3/3 Duktální epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–10 %)	0/3	0/3
Plíce (3)	0/3	0/3	0/3
Prostata (3)	2/3 Epiteliální buňky (od velmi slabého / téměř žádného zbarvení po slabé / střední zbarvení, 20 %)	0/3	0/3
Prs (3)	3/3 Duktální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–80 %)	0/3	0/3
Příštitná tělíska (3)	3/3 Hlavní buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–40 %)	0/3	0/3
Slezina (3)	0/3	0/3	0/3
Slinná žláza (3)	0/3	1/3 Acinitické epiteliální buňky, vážný typ (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 10 %) 3/3 Duktální epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 10–50 %)	0/3
Srdce (3)	0/3	0/3	0/3
Štítná žláza (3)	3/3 Folikulární epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–30 %)	0/3	0/3
Tenké střevo (3)	3/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 2–50 %)	3/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 2–50 %)	0/3
Tlusté střevo (3)	3/3 Epiteliální buňky tlustého střeva (od velmi slabého / téměř žádného zbarvení po slabé / střední zbarvení, 40–80 %)	0/3	0/3
Vaječník (3)	1/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 40 %)	0/3	0/3
Varlata (3)	0/3	0/3	0/3
Žaludek (3)	3/3 Epiteliální buňky (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 10–30 %)	0/3	0/3

**Abnormální tkáň:** V tabulce 5 je uveden souhrnný přehled imunoreaktivitu testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na panelu abnormálních tkání obarvených podle pokynů v tomto příbalovém letáku.

**Tabulka 5: Souhrn reaktivity abnormální tkáně (nádoru) v testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis). Procento (%) představuje frakci pozitivních nádorových buněk**

Typ nádoru (Počet testovaných)	Positivní membránové zbarvení (intenzita a % buněk)	Positivní cytoplazmatické zbarvení (intenzita a % buněk)	Nespecifické zbarvení
Hepatozellulární karcinom (3)	0/3	0/3	0/3
Karcinoid (3)	1/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 40 %)	0/3	0/3
Karcinom renálních buněk (3)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 20 %)	0/3	0/3
Leiomyom (3)	0/3	0/3	0/3
Lymfom (3)	0/3	0/3	0/3
Melanom (3)	0/3	0/3	0/3
Nediferencovaný karcinom (3)	0/3	0/3	0/3
Rakovina pankreatu (3)	1/3 (slabé až střední zbarvení, 50 %)	0/3	0/3
Rakovina plic (3)	3/3 (od velmi slabého / téměř žádného zbarvení po slabé / střední zbarvení, 5–40 %)	0/3	0/3
Rakovina prostaty (3)	3/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 20–40 %)	0/3	0/3
Rakovina prsu (3)	3/3 invazivní a in situ (od velmi slabého / téměř žádného zbarvení po silné zbarvení, 20–100 %)	0/3	0/3
Rakovina štítné žlázy (3)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, <1–2 %)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, <1–2 %)	0/3
Rakovina tlustého střeva (3)	3/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–30 %)	0/3	0/3
Rakovina vaječnicků (3)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 20–30 %)	0/3	0/3
Rakovina žaludku (3)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–15 %)	2/3 (velmi slabé / téměř žádné zbarvení, 5–15 %)	0/3
Sarkom (3)	0/3	0/3	0/3

### 17.3 Přesnost

Přesnost testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) byla hodnocena na jednom interním a na třech externích testovacích pracovištích. Výkonové parametry jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7. Průměrná procentuální shoda pozitivitu (APA), průměrná procentuální shoda negativitu (ANA) a celková procentuální shoda (OPA) byly stanoveny s oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti za použití přístupu bootstrap. U studií

s výslednou 100% shodou se intervaly spolehlivosti stanovily pomocí Wilsonova skóre a opravené velikosti vzorku, aby se vzala v úvahu korelace mezi srovnáními v rámci vzorku.

**Tabluka 6: Přesnost testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) testovaného na jednom interním pracovišti**

Studie přesnosti	Plán studie	% shoda (95% IS)
Mezi přístroji	Všech 60 vzorků rakoviny prsu (30 HER2-negativních a 30 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo testováno ve třech opakováních na každém ze tří přístrojů Dako Omnis. Reprodukovatelnost mezi přístroji byla stanovena na základě celkem 180 párových srovnání.	APA 100 % (94,0–100,0 %) ANA 100 % (94,0–100,0 %)
Mezi šaržemi	Všech 24 vzorků (12 HER2-negativních a 12 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo na přístroji Dako Omnis testováno s každou ze tří šarží soupravy a se třemi šaržemi nahraditelných komponent. Reprodukovatelnost mezi šaržemi byla stanovena na základě celkem 216 párových srovnání.	APA 97,3 % (97,3–98,2 %) ANA 97,1 % (97,1–98,1 %)
V rámci cyklu	Všech 48 vzorků rakoviny prsu (24 HER2-negativních a 24 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo testováno v pěti opakováních v cyklu na přístroji Dako Omnis. Cyklus byl definován jako nepřerušovaná řada barvení provedených během 24 hodin. Reprodukovatelnost v rámci cyklu byla stanovena na základě celkem 480 párových srovnání.	OPA 100 % (98,0–100,0 %)

APA = Průměrná pozitivní shoda; ANA = Průměrná negativní shoda; OPA = Celková procentuální shoda

**Tabluka 7: Přesnost testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) testovaného na třech externích pracovištích**

Studie přesnosti	Plán studie	% shoda (95% IS)
Mezi laboratořemi	Všech 40 vzorků rakoviny prsu (20 HER2-negativních a 20 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo testováno v pěti opakováních po dobu pěti dní, které nenásledovaly za sebou. Analýza mezi laboratořemi byla provedena mezi třemi laboratořemi a spočívala v párovém srovnání celkem 75 hodnot na vzorek.	APA 95,0 % (93,6–95,8 %)* ANA 95,2 % (94,1–95,9 %)*
Mezi pozorovateli	Všech 40 vzorků rakoviny prsu (ze studie mezi laboratořemi) (20 HER2-negativních a 20 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo testováno v pěti opakováních po dobu pěti dní, které nenásledovaly za sebou. Analýza mezi pozorovateli byla provedena na základě celkem 75 párových srovnání na vzorek ve třech laboratořích.	APA: 95,1 % (93,7–95,9 %)* ANA: 95,3% (94,0–95,9 %)*
Mezi dny/cykly (v rámci laboratoře), v rámci pozorovatele	Všech 40 vzorků rakoviny prsu (20 HER2-negativních a 20 HER2-positivních) s různou expresí HER2 IHC bylo testováno v pěti cyklech barvení na přístroji Dako Omnis po dobu pěti dní, které nenásledovaly za sebou. Analýza v rámci laboratoře / mezi dny a v rámci pozorovatele byla provedena na základě celkem 30 párových srovnání na vzorek ve třech laboratořích.	APA 95,2 % (94,3–95,6 %) ANA 95,4 % (94,7–95,7 %)

APA = Průměrná pozitivní shoda; ANA = Průměrná negativní shoda

\*Odchytky APA a ANA kvůli statistické metodě

## 18. Klinické charakteristiky výkonnosti

Všichni pacienti účastníci se klinických zkoušek s přípravkem Herceptin® byli vybráni pomocí zkušební imunocytochemické klinické studie (CTA). Žádný z pacientů v těchto zkouškách nebyl vybrán pomocí původního testu HercepTest™ nebo HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis). Originální test HercepTest™ byl porovnán se studií CTA na nezávislé skupině vzorků a byl shledán jako vhodný k dosažení přijatelných souhlasných výsledků. Současný produkt HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) se vyvinul a porovnal s původním HercepTest™. Bylo zjištěno, že všechna srovnání poskytla přijatelné souhlasné výsledky.

Údaje o porovnání metod v kapitolách 18.1 a 18.2 poskytují důkazy o HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) v porovnání s původním HercepTest™ (SK001) a HER2 IQFISH pharmDx (K5731). Současný vztah testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) ke klinickému výsledku Herceptin® nebyl zjišťován.

### 18.1 Hodnocení výkonu, porovnání metod IHC versus IHC

Hodnotila se rovnocennost výkonnosti HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) vs. HercepTest™ for Automated Link Platforms (SK001). Negativní procentuální shoda (NPA), pozitivní procentuální shoda (PPA) a celková procentuální shoda (OPA) byly vypočítány s oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti Wilsonova skóre.

**Tabluka 8: Studie porovnání metod HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) versus HercepTest™ for Automated Link Platforms (SK001)**

Studie porovnání metod	Plán studie	% shoda (95% IS)
IHC versus IHC	458 vzorků karcinomu prsu s rozsahem exprese HER2 bylo kvůli srovnávací analýze obarveno pomocí HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) a HercepTest™ for Automated Link Platform (SK001).	PPA: 93,3 % (89,2–95,9 %) NPA: 98,3 % (95,7–99,3 %) OPA: 94,5 % (92,1–96,3 %)

PPA = Pozitivní procentuální shoda; NPA = Negativní procentuální shoda; OPA = Celková procentuální shoda

### 18.2 Hodnocení výkonu, porovnání metod IHC versus FISH

Hodnotila se rovnocennost výkonnosti HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) vs. HER2 IQFISH pharmDx (K5731). Negativní procentuální shoda (NPA) a pozitivní procentuální shoda (PPA) byly vypočítány s oboustrannými 95% intervaly spolehlivosti Wilsonova skóre.

**Tabluka 9: Studie porovnání metod HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) versus HER2 IQFISH pharmDx (K5731)**

Studie porovnání metod	Plán studie	% shoda (95% IS)
IHC versus FISH	422 vzorků karcinomu prsu s rozsahem exprese HER2 bylo kvůli srovnávací analýze obarveno pomocí HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) a HER2 IQFISH pharmDx (K5731).	PPA: 93,1 % (87,0–96,5 %) NPA: 98,2 % (95,4–99,3 %)

NPA = Negativní procentuální shoda; PPA = Pozitivní procentuální shoda

## 19. Řešení problémů

Informace o dalších řešeních naleznete v příručce pro vzdělávání Dako: Immunohistochemical Staining Methods<sup>17</sup>, v části Řešení problémů, nebo se obraťte na patologickou podporu společnosti Agilent a nahlaste neobvyklé zbarvení.

Dako Omnis je automatizovaný systém navržený tak, aby upozornil uživatele, pokud se v cyklu vyskytne jakýkoliv parametr mimo specifikace. Podrobnosti viz Základní uživatelská příručka a Příručka pro pokročilé uživatele Dako Omnis Basic. Niže je uvedena příručka k řešení problémů pro výsledky a stavy, které nelze snadno identifikovat prostřednictvím systému výstrah a upozornění přístroje Dako Omnis. Řešení problémů při používání komponent vyhrazených šarží v HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (primární protilátka, vizualizační reagentie a Control Slides) viz Základní uživatelská příručka Dako Omnis.

Uživatel musí vždy zajistit dodržování plánu údržby přístroje Dako Omnis. Vždy zajistíte použití příslušných kontrol popsanych v části Kontrola kvality.

Tabulka 10: Řešení problémů

Problém	Příčina problému	Doporučené řešení
<b>1. Podložní skla nejsou zbarvena nebo jsou zbarvena slabě</b>	1a. Výběr špatného protokolu a činidel.	1a. Zkontrolujte historii podložního skla a ověřte, zda byl zvolen správný protokol.
	1b. Nadměrné zahřívání namontovaných tkáňových řezů před vložením do přístroje Dako Omnis může vést ke ztrátě imunoreaktivity a morfologie.	1b. Tkáňové řezy sušte při teplotě 60 °C po maximálně jednu hodinu. Sušení tkáňových řezů při zvýšené teplotě se smí provádět pouze v kalibrované troubě s rovnoměrným rozložením tepla. <sup>15</sup>
	1c. Nesprávné skladovací podmínky pro reagentie nebo tkáňové řezy	1c. Zkontrolujte, zda jsou reagentie správně uloženy v souladu s uvedenými podmínkami skladování. Ujistěte se, že tkáňové řezy jsou obarveny v rámci doporučených pro skladování tkáňových řezů (kapitola 10).
	1d. Byla použita nevhodná metoda fixace.	1d. Ujistěte se, že pacientská tkáň není fixována po příliš krátkou nebo příliš dlouhou dobu nebo že nebyl použit jiný fixační prostředek.
	1e. Byla použita reagentie po datu expirace.	1e. Zajistěte, aby se nepoužívala reagentie po datu expirace.
	1f. Byla použita reagentie s ukončenou aplikační stabilitou.	1f. Zajistěte, aby se nepoužívala reagentie s ukončenou aplikační stabilitou.
	1g. Nesprávné umístění dynamických vík barvicích modulů.	1g. Zkontrolujte umístění dynamických vík.
	1h. Poškozená dynamická víka	1h. Zkontrolujte neporušenost dynamických vík.
	1i. Ke zředění koncentráту Target Retrieval Solution se nepoužívá voda (destilovaná nebo deionizovaná) v kvalitě reagentie.	1i. Zajistěte, aby se k přípravě roztoku 1x Target Retrieval Solution používala voda (destilovaná nebo deionizovaná) v kvalitě reagentie. Prosím pozor, ne všechny zdroje destilované nebo deionizované vody mají dostatečnou kvalitu/čistotu pro přípravu reagentie IHC. Agilent doporučuje, aby se k přípravě reagentie používala destilovaná nebo deionizovaná voda v kvalitě reagentie nebo podobně čistá voda.
	1j. Používá se nesprávný roztok Target Retrieval Solution.	1j. Zajistěte, aby se používal roztok Target Retrieval Solution specifikovaný v částech Dodané materiály, Substituty komponent soupravy a/nebo Příprava reagentie.
	<b>2. Neschválené barvení tkáně pro pozitivní kontrolu nebo kontrolního sklíčka</b>	2a. Degradace kontrolního sklíčka nebo činidel nebo artefaktů cyklu
<b>3. Nadměrně zbarvené pozadí sklíček</b>	3a. K montáži řezů na podložní skla byly použity škrobové přísady.	3a. Pro lepení řezů na podložní skla nepoužívejte žádné přísady. Mnohé přísady jsou imunoreaktivní.
	3b. Po provedení barvení v přístroji Dako Omnis řezy vyschly.	3b. Zkontrolujte, že je ve výstupním zásobníku dostatečné množství vody.
	3c. Před přiložením krycích skel jsou řezy vysušeny.	3c. Nedopusťte, aby po vysunutí z přístroje Dako Omnis a před přiložením krycího skla došlo k vysušení obarvených sklíček.
	3d. Byla použita nevhodná metoda fixace.	3d. Zkontrolujte, zda bylo použito doporučené fixativum. Jiná fixativa mohou zapříčinit přílišné zbarvení pozadí.
	3e. Parafín odstraněn pouze částečně.	3e. Zkontrolujte vzhled vazebného ředidla. Jemným drnutím spojek odstraňte nečistoty. Po čištění zkontrolujte neporušenost spojek na zadní straně zásobních lahví. Podrobnosti naleznete v základní uživatelské příručce Dako Omnis.
	3f. Nespecifická vazba reagentií k tkáni.	3f. Ujistěte se, že se používá správná metoda fixace vzorku, a vyhněte se velkým oblastem nekrozy.
	3g. Opakované použití míchacích stripů.	3g. Ujistěte se, že se používají nové míchací stripy.
<b>4. Tkáň je oddělená od sklíček</b>	4a. Použití nesprávných podložních skel.	4a. Použijte mikroskopická sklíčka FLEX IHC (kód K8020) nebo sklíčka Superfrost Plus.
	5a. Byla použita nevhodná metoda fixace.	5a. Překontrolujte, že byla použita pouze správná fixativa a fixační metody.

Problém	Příčina problému	Doporučené řešení
5. Nadměrně silné specifické barvení	5b. Ke zředění koncentráту Target Retrieval Solution se nepoužívá voda (destilovaná nebo deionizovaná) v kvalitě reagentie.	5b. Zajistěte, aby se k přípravě roztoku 1x Target Retrieval Solution používala voda (destilovaná nebo deionizovaná) v kvalitě reagentie. Prosím pozor, ne všechny zdroje destilované nebo deionizované vody mají dostatečnou kvalitu/čistotu pro přípravu reagentie IHC. Agilent doporučuje, aby se k přípravě reagentie používala destilovaná nebo deionizovaná voda v kvalitě reagentie nebo podobně čistá voda.
6. Target Retrieval Solution (koncentrát nebo pracovní roztok) je před vložením do přístroje Dako Omnis zakalený	6a. Roztok byl uchováván nesprávně nebo vypršelo datum jeho použitelnosti.	6a. Zkontrolujte datum expirace a podmínky pro skladování soupravy vytištěné na obalu. Target Retrieval Solution zlikvidujte.
7. Sklíčko je označeno	7a. Byla použita reagentie po datu expirace. 7b. V přístroji Dako Omnis je uložena reagentie vyhrazené šarže s ukončenou ověřenou aplikační stabilitou. 7c. Uplynulo datum plánované údržby nebo jiné faktory.	7a–c. Označená sklíčka musí vyhodnotit kvalifikovaný personál. Jsou-li potřeba další kroky, kontaktujte zástupce společnosti Dako.













**POZNÁMKA:** V případě, že problém nelze připsat žádné z výše uvedených příčin, nebo pokud doporučené nápravné opatření nevyřeší problém, zavolejte patologickou podporu společnosti Agilent a požádejte o další pomoc. Další informace o technikách barvení a přípravě vzorků naleznete v příručce pro vzdělávání Dako: Immunohistochemical Staining Methods<sup>17</sup> (k dispozici na webu [www.agilent.com](http://www.agilent.com)), Atlas of Immunohistochemistry<sup>25</sup> and Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis (Praktický přístup k diagnóze nádorů).<sup>26</sup>

## 20. Literatura

- Coussens, L.; Yang-Feng, T. L.; Liao, Y. C.; Chen, E.; Gray, A.; McGrath, J.; Seeburg, P. H.; Libermann, T. A.; Schlessinger, J.; Francke, U.; et al., Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985, 230 (4730), 1132-9.
- Schechter, A. L.; Hung, M. C.; Vaidyanathan, L.; Weinberg, R. A.; Yang-Feng, T. L.; Francke, U.; Ullrich, A.; Coussens, L., The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985, 229 (4717), 976-8.
- Press, M. F.; Cordon-Cardo, C.; Slamon, D. J., Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990, 5 (7), 953-62.
- Lonardo, F.; Di Marco, E.; King, C. R.; Pierce, J. H.; Segatto, O.; Aaronson, S. A.; Di Fiore, P. P., The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *The New biologist* 1990, 2 (11), 992-1003.
- Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B.; Henner, D.; Wong, W. L.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E.; Shepard, H. M., Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89 (10), 4285-9.
- Hudziak, R. M.; Lewis, G. D.; Winget, M.; Fendly, B. M.; Shepard, H. M.; Ullrich, A., p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and cellular biology* 1989, 9 (3), 1165-72.
- Lewis, G. D.; Figari, I.; Fendly, B.; Wong, W. L.; Carter, P.; Gorman, C.; Shepard, H. M., Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 1993, 37 (4), 255-63.
- Baselga, J.; Norton, L.; Albanell, J.; Kim, Y. M.; Mendelsohn, J., Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer research* 1998, 58 (13), 2825-31.
- Cameron, D.; Piccart-Gebhart, M. J.; Gelber, R. D.; Procter, M.; Goldhirsch, A.; de Azambuja, E.; Castro, G., Jr.; Untch, M.; Smith, I.; Gianni, L.; Baselga, J.; Al-Sakaff, N.; Lauer, S.; McFadden, E.; Leyland-Jones, B.; Bell, R.; Dowsett, M.; Jackisch, C., 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet (London, England)* 2017, 389 (10075), 1195-1205.
- Untch, M.; Loibl, S.; Bischoff, J.; Eidtmann, H.; Kaufmann, M.; Blohmer, J. U.; Hilfrich, J.; Strumberg, D.; Fasching, P. A.; Kreienberg, R.; Tesch, H.; Hanusch, C.; Gerber, B.; Rezai, M.; Jackisch, C.; Huober, J.; Kuhn, T.; Nekljudova, V.; von Minckwitz, G., Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 2012, 13 (2), 135-44.
- Kaufman, B.; Mackey, J. R.; Clemens, M. R.; Bapsy, P. P.; Vaid, A.; Wardley, A.; Tjulandin, S.; Jahn, M.; Lehle, M.; Feyereislova, A.; Revil, C.; Jones, A., Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAndEM study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, 27 (33), 5529-37.
- Piccart-Gebhart, M. J.; Procter, M.; Leyland-Jones, B.; Goldhirsch, A.; Untch, M.; Smith, I.; Gianni, L.; Baselga, J.; Bell, R.; Jackisch, C.; Cameron, D.; Dowsett, M.; Barrios, C. H.; Steger, G.; Huang, C. S.; Andersson, M.; Inbar, M.; Lichinitser, M.; Lang, I.; Nitz, U.; Iwata, H.; Thomssen, C.; Lohrisch, C.; Suter, T. M.; Ruschoff, J.; Suto, T.; Gatrex, V.; Ward, C.; Straehle, C.; McFadden, E.; Dolci, M. S.; Gelber, R. D., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* 2005, 353 (16), 1659-72.
- Department of Health, Education and Welfare, National Institutes for Occupational Safety and Health, Rockville, MD, Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides. DHHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Third Edition. CLSI document M29-A3. 3rd ed.; 2005.
- Lundgaard Hansen B, W. H., Moller K Excessive section drying of breast cancer tissue prior to deparaffinisation and antigen retrieval causes a loss in HER2 immunoreactivity, *Immunocytochemistry (UK NEQAS ICC and ISH)*; 2008; pp 119-22.
- Kiernan, J. A., *Histological and histochemical methods: theory & practice*. New York: Pergamon Press: 1981.
- Taylor, C. R.; Rudbeck, L., *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods*. 6th ed.; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark: 2013.
- Hewitt, S. M.; Robinowitz, M.; Bogen, S. A.; Gown, A. M.; Kalra, K. L.; Otis, C. N.; Spaulding, B.; Taylor, C. R., *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline Second Edition*. CLSI document I/LA28-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- Nadji, M.; Morales, A. R., Immunoperoxidase: Part I. The Technique and Its Pitfalls. In *Laboratory Medicine*, 1983; Vol. 14(12), pp 767-771.

20. Bast, R. C., Jr.; Pusztai, L.; Kerns, B. J.; MacDonald, J. A.; Jordan, P.; Daly, L.; Boyer, C. M.; Mendelsohn, J.; Berchuck, A., Coexpression of the HER-2 gene product, p185HER-2, and epidermal growth factor receptor, p170EGF-R, on epithelial ovarian cancers and normal tissues. *Hybridoma* 1998, 17 (4), 313-21.
21. Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szigartyo, C. A.; Odeberg, J.; Djureinovic, D.; Takanen, J. O.; Hober, S.; Alm, T.; Edqvist, P. H.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Rockberg, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J. M.; Hamsten, M.; von Feilitzen, K.; Forsberg, M.; Persson, L.; Johansson, F.; Zwaehlen, M.; von Heijne, G.; Nielsen, J.; Ponten, F., Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015, 347 (6220), 1260419.
22. Wolff, A. C.; Hammond, M. E.; Hicks, D. G.; Dowsett, M.; McShane, L. M.; Allison, K. H.; Allred, D. C.; Bartlett, J. M.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; Hanna, W.; Jenkins, R. B.; Mangu, P. B.; Paik, S.; Perez, E. A.; Press, M. F.; Spears, P. A.; Vance, G. H.; Viale, G.; Hayes, D. F., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013, 31 (31), 3997-4013.
23. Omata, M.; Liew, C. T.; Ashcavai, M.; Peters, R. L., 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.
24. Herman, G. E.; Elfont, E. A., The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 1991, 66 (4), 194-9.
25. Tubbs RR, G. G., Petras RE. , Specimen processing and quality assurance. *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press: 1986; Vol. 16.
26. Nadji M, M. A., Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. Press, C. A. S. C. P., Ed. Chicago, 1986.

## 21. Vysvětlivky k symbolům

 REF	Katalogové číslo		Obsah postačující pro <n> testů
 IVD	In vitro diagnostický zdravotnický prostředek		Křehké: zacházejte opatrně
	Viz návod k použití	 LOT	Číslo šarže
	Teplotní rozmezí od do		Použitelné do
	Uchovávat v temnu		Výrobce
		Piktogram GHS (viz část o bezpečnostních opatřeních)	
 EC REP	Autorizovaný zástupce v Evropské unii		



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
 No. 1 Yishun Avenue 7  
 Singapore, 768923  
 Tel. +44 161 492 7050  
 www.agilent.com