

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

Katalogové číslo 790-2991 (50 testů)

INDIKACE A POUŽITÍ

Použití

Toto činidlo je určeno k diagnostice *in vitro*.

Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5)) je králičí monoklonální protilátka určená pro laboratorní použití k semikvantitativní detekci antigenu HER2 v řezech normální a neoplastické tkáně, fixované ve formalínu, zalité v parafínu, v barvicím automatu výrobce Ventana. Slouží jako pomůcka v hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u kterých se uvažuje o léčbě přípravkem Herceptin®.

Poznámka: Všichni pacienti účastníci se klinických zkoušek s přípravkem Herceptin byli vybráni pomocí zkušební klinické studie. Žádný pacient účastník se těchto zkoušek nebyl vybrán pomocí PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5). Protilátka PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) byla porovnána s PATHWAY HER-2 (clone CB11) Primary Antibody na sadě samostatných vzorků a bylo shledáno, že poskytuje přijatelně shodné výsledky. Současný vztah PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) ke klinickému výsledku nebyl zjišťován.

Systém *Ventana Image Analysis System (VIAS™)* je podpůrný systém obrazové analýzy prováděný pomocí počítače, funkčně navázaný na interaktivní mikroskop. Slouží jako pomůcka patologa při detekci, klasifikaci a výpočtu buněk na základě intenzity markeru, velikosti a tvaru, za použití příslušných kontrol za účelem validace odečtu *VIAS*.

Pouze na lékařský předpis.

Souhrn a vysvětlení

PATHWAY anti-HER-2/*neu* je králičí monoklonální protilátka (klon 4B5), která je nasměrována proti vnitřní doméně onkoproteinu c-erbB-2. Onkoprotein c-erbB-2 byl klonován a charakterizován Akiyamou a kol. v roce 1986.¹ Je to transmembránový glykoprotein o průměrné hmotnosti 185 kD, který je strukturálně podobný receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Protein je spojován s tyrosinkinázovou aktivitou, která je podobná jako u mnohých receptorů růstových faktorů a u transformujících proteinů rodiny *src*. Kódující sekvence odpovídá extracelulární vázající doméně a intracelulární kinázové doméně. To naznačuje, že HER2 může být zapojen v signální transdukcii a stimulaci mitogenní aktivity.¹

Testy Western blotting bylo prokázáno, že klon 4B5 reaguje s proteinem o hmotnosti 185 kD z buněčných lysátů SK-BR-3. SK-BR-3 je buněčná linie karcinomu prsu, která má 128-násobnou nadměrnou expresi HER2 mRNA.² Velikost identifikovaného pruhu koreluje s pruhem označeným Akiyama et al pro protein HER2 (185 kD).¹ Od roku 1950 se používá v imunohistochemii k detekci specifických antigenů v buňkách nebo tkáni.³ Použití enzymů a peroxidázy jako markerů pro imunohistochemii bylo hlášeno Nakanem a Piercem v roce 1967.⁴ Zvýšená senzitivita detekčního systému avidin-biotin-peroxidázy oproti metodě s enzymem značenou protilátkou byla zdokumentována Hsu et al v roce 1981.⁵

Protein HER2 je exprimován v úrovni detekovatelné imunohistochemicky u až 20 procent adenokarcinomů z různých oblastí. Pozitivní na HER2 je 15 až 30 procent invazivních ductálních karcinomů.⁶ Téměř všechny případy Pagetovy nemoci prsu⁷ a až 90 procent případů ductálních karcinomů *in situ* typu komedo je rovněž pozitivních.⁶ Imunohistochemická detekce hyperexprese proteinu HER2 se rovněž používá jako pomůcka při určování pacientů, u kterých je vhodná léčba přípravkem Herceptin.⁸

Výsledky zabarvení v normálních a neoplastických tkáních a zabarvení 322 případů karcinomu prsu pomocí PATHWAY HER2 (4B5) byly vyhodnoceny společností Ventana.

V normálních testovaných tkáních byla exprese konzistentní s publikovanou literaturou, kde nebylo neočekávané specifické cytoplazmatické / membránové zabarvení, s následujícími výjimkami: dva případy mandlí vykazaly membránové zabarvení epitelálních buněk, jeden případ příštítné žlázy a jeden případ epitelu jícnu. Mezi testovanými neoplastickými tkáněmi se objevilo cytoplazmatické / membránové zabarvení v buňkách rakoviny prsu, tračnicku a vaječnicku. Pomocí Ventana PATHWAY HER2 (4B5) bylo hodnoceno tři sta dvacet dva (322) karcinomů prsu v porovnávací studii s PATHWAY HER-2 (CB11). Byla prokázána výrazná korelace mezi těmito dvěma testy. Další informace viz část Souhrn očekávaných výsledků.

Ventana PATHWAY HER2 (4B5) v kombinaci s Ventana *MIEW DAB* Detection Kit používá biotinylované sekundární protilátky za účelem lokalizace vazby primární

protilátky PATHWAY HER2 (4B5) (vytvořené pomocí syntetického peptidu, který odpovídá místu na vnitřní doméně proteinu HER2). Následuje vazba avidin/streptavidinového enzymového konjugátu k biotinu. Komplex je poté vizualizován pomocí sraženého enzymového produktu.

Použití předem naředěné protilátky PATHWAY HER2 (4B5) výrobce Ventana a detekčních souprav *MIEW DAB* k okamžitému použití, ve spojení s barvicím automatem Ventana snižuje možnost lidské chyby a variability vznikající při jednotlivém ředění činidla, manuálním pipetování a manuální aplikaci činidla.

KLINICKÝ VÝZNAM

Rakovina prsu je nejčastější karcinom vyskytující se u žen a je druhou nejčastější příčinou smrti související s rakovinou. Šance na přežití žen s rakovinou prsu v Severní Americe je jedna ku osmi.⁹ Včasné zjištění nemoci a správné léčebné terapie mohou výrazně ovlivnit celkovou délku dalšího života.¹⁰ Malé vzorky tkání mohou být snadno použity v rutinní imunohistochemii (IHC), což činí z této metody ve spojení s protilátkami, které detekují antigeny důležité pro interpretaci karcinomu, účinný nástroj patologa při stanovování diagnózy a prognózy choroby. Dnes představuje onkoprotein c-erbB-2 (HER2) důležitý buněčný znak rakoviny prsu.

HER2 je intracelulární membránový protein zjištěný v celulární membráně.¹¹ Je úzce příbuzný s EGFR a podobně jako EGFR má tyrosinkinázovou aktivitu.¹ Genová amplifikace a odpovídající hyperexprese c-erbB-2 byly zaznamenány v různých nádorech, včetně karcinomu prsu.^{11,12}

Bylo prokázáno, že nově vyvinutý terapeutický lék Herceptin je schopen u některých pacientů zastavit rozvoj karcinomu prsu, v některých případech reverzovat růst rakoviny.⁸ Tento lék je humanizovaná monoklonální protilátka, která váže protein HER2 na rakovinových buňkách. Z tohoto důvodu pomáhá léčba přípravkem Herceptin pouze pacientům s karcinomem prsu pozitivním na HER-2/*neu*. Diagnostiky *in vitro* slouží k determinaci stavu HER2 v karcinomech prsu jsou důležitou pomůckou lékařů při rozhodování o terapii přípravkem Herceptin.

Při interpretaci výsledků detekčních systémů pro HER2 se musí brát do úvahy fakt, že HER2 je exprimován jak v rakovinových nádorech prsu, tak ve zdravých tkáních, ačkoli v různých úrovních a s různým vzorem exprese.¹³ Histologické tkáňové preparáty využívají výhodu morfologie intaktní tkáně a napomáhají tak interpretaci pozitivní vzorku na HER2. Všechny histologické testy musí být vyhodnocovány specialisty v morfologii nebo patologii rakoviny prsu a výsledky je třeba používat ve spojení s morfologickými studiemi a řádnými kontrolami a používat je ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními údaji.

Principy a postupy

PATHWAY HER2 (4B5) je králičí monoklonální protilátka, která se váže v parafinových tkáňových řezech na HER2. Specifickou protilátku je možno lokalizovat buď vytvořením sekundární protilátky konjugované biotinem, která rozpoznává králičí imunoglobuliny a následným přidáním konjugátu streptavidin-křenuv peroxidáza (HRP), (detekční souprava *MIEW DAB*) nebo konjugátem sekundární protilátka-HRP (detekční souprava *ultraView Universal DAB*). Komplex specifické protilátky a enzymu je poté viditelný jako sraženina produktu enzymové reakce. Každý krok zahrnuje inkubaci v přesně stanovené době a teplotě. Na konci každého inkubačního kroku jsou řezy v barvicím automatu Ventana opláchnuty za účelem ukončení probíhající reakce a k odstranění nevázaného materiálu, který by mohl bránit požadované reakci v následujících krocích. Automat rovněž přidá roztok k zakrytí sklička *Liquid Coverslip™*, který minimalizuje odpařování vodních činidel z podložního sklička se vzorkem.

Klinické případy je třeba vyhodnocovat v kontextu účinnosti správných kontrol. Společnost Ventana doporučuje zahrnout tkáň pro pozitivní kontrolu, zpracované stejným způsobem jako vzorky pacienta (například slabě pozitivní karcinom prsu nebo dělohy). Ke skličku obarveném protilátkou PATHWAY HER2 (4B5) je třeba provést barvení dalšího sklička protilátkou pro negativní kontrolu Ventana CONFIRM™ Negative Control Rabbit Ig. Aby test mohl být považován za platný, musí tkáň pro pozitivní kontrolu vykazat membránové zabarvení nádorových buněk. Tyto komponenty musí být po obarvení protilátkou pro negativní kontrolu CONFIRM Negative Control Rabbit Ig negativní. Dále se doporučuje, aby každá dávka zpracovávaných vzorků a každý cyklus na barvicím automatu Ventana zahrnoval skličko s tkání pro negativní kontrolu (například HER-2/*neu* negativní karcinom prsu). Tkáň pro negativní kontrolu se musí barvit protilátkou PATHWAY HER2 (4B5), aby se ověřilo, že antigen byl zhodnocen a že další postupy předběžného zpracování nevytvořily falešně pozitivní zabarvení.

VIAS je přístroj interaktivního histologického zobrazování, který provádí zpracování obrazu pomocí mikroskopu, digitální barevné videokamery, počítače a softwaru pro obrazovou analýzu za účelem získání a analýzy obrazů zabarvených sklíček protilátkou PATHWAY HER-2/*neu* (4B5), které si zvolil uživatel.

Přístroj slouží jako pomůcka patologa při analýze poskytováním semikvantitativního vstupu jako doplňku ke kvalitativnímu vyhodnocení sklíček barvených PATHWAY HER-2/ neu (4B5). Patolog provádí obvyklý manuální odečet sklíček HER-2/ neu k vyhodnocení exprese HER-2/ neu na základě stupnice (0, 1+, 2+, 3+) pomocí mikroskopu VIAS. Patolog má poté možnost zvolit více pohledů použitím mikroskopu VIAS a počítače pro provedení semikvantitativní analýzy. Přístroj VIAS zpracovává barevné obrázky, zvolené uživatelem, k vyhodnocení exprese HER-2/ neu pomocí softwarového algoritmu k doplnění kvalitativního odečtu patologa.

Patolog provede výslednou interpretaci na základě obou informací, semikvantitativní a kvalitativní. Doporučuje se, aby uživatel při použití systému *Ventana Image Analysis System* postupoval podle pokynů v příbalovém letáku k protilátce Ventana PATHWAY HER-2/ neu (4B5) a podle připojených Pravidel hodnocení podle stupnice.

Další informace naleznete v Návodu k obsluze systému *Ventana Image Analysis System (VIAS)*.

MATERIÁLY A METODY

Dodávaná činidla

Katalogové č. 790-2991: PATHWAY anti-HER-2/ neu (4B5) Primary Antibody obsahuje dostatek činidla pro 50 testů.

1 – 5 mL dávkovač PATHWAY anti-HER-2/ neu (4B5) Primary Antibody obsahuje asi 30 µg králičí monoklonální protilátky nasměrované proti lidskému antigenu c-erbB-2.

Protilátka je naředěna fyziologickým roztokem pufovaným v 0,05 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,05 % Brij-35 s obsahem 0,3 % proteinového nosiče, 0,05 % azidu sodného a konzervačního činidla. Ze zásobního roztoku je zde přítomno asi 0,25 %, stopy fetálního telecího séra.

Celková proteinová koncentrace činidla je v průměru 16 mg/ mL. Koncentrace specifické protilátky je asi 6 µg/ mL. PATHWAY anti-HER-2/ neu (4B5) Primary Antibody je králičí naředěný IgG ze supernatantu tkáňových kultur. V tomto produktu není známa žádná irelevantní reaktivita protilátky.

Rekonstituce, smísení, ředění, titrace

Protilátka je optimalizována pro použití na barvicích automatech Ventana v kombinaci s detekční soupravou Ventana VIEW DAB a je kompatibilní s detekční soupravou *ultraView Universal DAB*. Není vyžadována rekonstituce, smísení, ředění nebo titrace.

Další ředění může způsobit ztrátu zabarvení antigenu. Uživatel musí případně změny ověřit. Rozdíly ve zpracování tkáně a technických postupech v laboratoři mohou způsobit výraznou variabilitu výsledků a vyžadují pravidelné provádění kontrol (viz část Postupy kontroly kvality).

Potřebné materiály a činidla, která se nedodávají

Následující činidla a materiály mohou být potřebné, ale nejsou součástí dodávky:

- Ventana CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. č. 760-1029) (činidlo pro negativní kontrolu)
- Mikroskopická skla Superfrost™ Plus (VWR kat. č. 48311-703 nebo ekvivalentní)
- Pozitivní a negativní tkáňové kontroly (invazivní karcinom prsu a normální tkáň prsu)
- Štítky s čárovým kódem (odpovídající testované negativní kontrole a primární protilátce)
- Nádoby nebo lázně na barvení
- Barvicí nádobí Tissue-Tek®
- Časový spínač (umožňující intervaly 2 – 10 minut)
- Xylen (histologický stupeň)
- Etanol nebo reagenční alkohol (histologický stupeň)
 - 100 % roztok: neředěný etanol nebo reagenční alkohol
 - 95 % roztok: smísit 95 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 5 díly deionizované vody
 - 80 % roztok: smísit 80 dílů etanolu nebo reagenčního alkoholu s 20 díly deionizované vody
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Dekloační komora (Decloaking Chamber) Biocare Medical (kat. č. DC2002) (barvicí automaty NexES® IHC)
- Barvicí automaty NexES IHC, BenchMark® Series
- Detekční soupravy Ventana VIEW DAB (kat. č. 760-091) nebo *ultraView Universal DAB* (kat. č. 760-500)
- Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit (kat. č. 760-050)
- Ventana APK Wash (10X)* (kat. č. 250-042) (Barvicí automaty NexES IHC)
- Ventana Liquid Coverslip™ (Low Temperature) (Barvicí automaty NexES IHC)

- Ventana EZ Prep™ (10X)* (kat. č. 950-102) (Barvicí automaty BenchMark Series)
- Ventana Reaction Buffer (10X)* (kat. č. 950-300) (Barvicí automaty BenchMark Series)
- Ventana Liquid Coverslip (High Temperature) (kat. č. 650-010) (Barvicí automaty BenchMark Series)
- Ventana Cell Conditioning 1 (Pre-dilute) (CC1) (kat. č. 950-124)
- Kontrastní barvivo Ventana Hematoxylin II (kat. č. 790-2208)
- Ventana Bluing Reagent (kat. č. 760-2037)
- Permanentní montovací médium (PermOUNT®, Fisher, kat. č. SP15-500 nebo ekvivalentní)
- Krycí sklíčka (dostatečná k zakrytí tkání, např. VWR, kat. č. 48393-60 nebo ekvivalentní)
- Krycí roztok pro barvicí automat (krycí roztok pro barvicí automat Tissue-Tek® SCA)
- Absorpční utěrky (pokud se provádí ruční odmaskování antigenu)
- Světelný mikroskop (20-80X) nebo Ventana Image Analysis System (VIAS)*

* Podle potřeby specifických aplikací.

Skladování a manipulace

Skladovat při 2 – 8 °C. Nezmrazovat. Pokud se činidla skladují za jakýchkoli jiných než v příbalovém letáku uvedených podmínek, musí je uživatel ověřit.

Před použitím je třeba nechat stát PATHWAY HER2 (4B5) nejméně 30 minut v pokojové teplotě. Aby byl zajištěn správný výkon činidla a stabilita protilátky po každém cyklu, musí být dávkovač uzavřen víčkem a okamžitě umístěn ve vertikální poloze do lednice.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Je-li řádně skladováno, je činidlo stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte činidla po skončení expirační doby pro předepsanou metodu skladování. Produkt je navržen tak, aby měl platnost 18 měsíců od data výroby.

Tento produkt nejeví žádné zjevné známky nestability, a proto by se pozitivní a negativní kontroly měly provádět současně s neznámými vzorky. Kontaktujte místní zastoupení společnosti Ventana, objeví-li se příznaky nestability činidla.

Sběr vzorků a příprava pro analýzu

Pro použití s protilátkou PATHWAY HER2 (4B5), která se používá s detekčními soupravami Ventana na barvicích automatech Ventana, jsou vhodné tkáně fixované ve formalínu a zalité v parafínu, se zhodnocováním antigenu (viz část Potřebné materiály a činidla, která nejsou součástí dodávky).

Doporučený fixační prostředek je 10 % neutrální pufovaný formalin. Používá se množství 15 až 20 násobku objemu tkáně. Žádné fixativum nebude penetrovat po dobu 24 hodin pevnou tkáň o velikosti větší než 2 až 3 mm nebo porézní tkáň větší než 5 mm. Řezy tkání o tloušťce 3 mm nebo menší by se měly fixovat ne méně než 4 hodiny a ne více než 8 hodin. Fixaci lze provádět při pokojové teplotě (15 – 25 °C).¹⁴

Kostní tkáně je nutno před zpracováním tkáně odvápnit a tím usnadnit řezání tkáně a zabránit poškození nožů mikrotomu.¹⁴

Správně fixované a zalité tkáně exprimující antigen zůstanou stabilní nejméně 2 roky, pokud jsou skladovány v chladnu (15 – 25 °C). Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) of 1988, 42CFR493.1259(b) (Zákon o zdokonalení klinických laboratoří z roku 1998, 42CFR493.1259(b) od profesionálních uživatelů ve Spojených státech vyžaduje: „Laboratoř musí uchovávat obarvená podložní skla nejméně deset let od data testu a bločky vzorků nejméně dva roky od data testu“.

Řezy pro podložní skla by měly být řezány přibližně na tloušťku 5 µm. Sklíčka by měla být Superfrost Plus nebo ekvivalentní. Tkáně se musí po umístění na sklíčka nechat sušit přes noc v pokojové teplotě.¹⁴ Studie provedené společností Ventana naznačují, že usušené řezy tkání a řezy buněčných linií, které jsou skladovány při teplotě 2 – 8 °C, jsou stabilní po dobu nejméně 6 měsíců. Každá laboratoř musí pro vlastní postupy a podmínky prostředí skladování ověřit stabilitu tkáňových řezů.

Postup ruční deparafinace

Je vyžadováno, pokud je použit barvicí automat NexES IHC, nebo pokud není navolena funkce deparafinace na sériovém barvicím automatu BenchMark Series:

- Další instrukce o tom, kdy je potřeba opatřit sklíčka štítkem s čárovým kódem naleznete v části Návod k použití ke konkrétnímu barvicímu automatu.
- Ponořit sklíčka postupně do 3 xylenových lázní vždy na 5 ± 1 minut.
- Přenést sklíčka do 100 % etanolu a ponořit je postupně do 2 lázní vždy na 3 ± 1 minut.
- Přenést sklíčka do 95 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.
- Přenést sklíčka do 80 % etanolu a ponořit je do lázně s tímto roztokem na 3 ± 1 minut.

- Přenést sklička do lázně s deionizovanou nebo destilovanou vodou a ponořit je minimálně 10krát.
- Přenést sklička do roztoku APK Wash (1X) nebo do pufového roztoku. V případě použití roztoku APK Wash, musí sklička zůstat v roztoku až do provedení barvicího cyklu. V případě použití pufového roztoku, musí sklička zůstat v roztoku, až do doby provedení postupu odmaskování antigenu. Nenechat sklička vysušit.

Sklička barvená na sériových barvicích automatech BenchMark Series mohou být deparafinována v přístroji. Zvolíte-li tuto vlastnost, opatřete sklička čárovým kódem a umístíte je do přístroje. Jestliže tuto vlastnost nezvolíte, pokračujte podle postupu ruční deparafinace výše.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ PŘEDPISY

- Toto činidlo je určeno k diagnostice *in vitro*.
- Při manipulaci s činidly dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Používejte rukavice na jedno použití, manipulujete-li s nebezpečnými karcinogeny nebo toxickými materiály (jako je například: xylen nebo formaldehyd). Nepoužívat v blízkosti otevřeného ohně. Nekurte, nejezte a nepijte v místnosti, kde se manipuluje se vzorky nebo činidly.
- Zabraňte kontaktu činidel s očima a sliznicí. Jestliže se činidla dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je vydatným množstvím vody.
- Vzorky pacientů a všechny materiály, které s nimi přijdou do kontaktu, musí být považovány za biologicky nebezpečné látky a jejich likvidace musí probíhat podle příslušných bezpečnostních předpisů. Nikdy nepipetujte ústy.
- Zabraňte mikrobiologickému znečištění činidel, neboť toto by způsobilo nesprávné výsledky.
- Nedodržení příslušných inkubačních dob a teplot může vést k chybným výsledkům. Jakoukoliv změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Činidla byla optimálně naředěna a další ředění by mohlo způsobit ztrátu zbarvení. Jakoukoliv změnu tohoto druhu musí uživatel ověřit.
- Při dodržení návodu k použití není tento výrobek klasifikován jako nebezpečná látka. Konzervační prostředek činidla je azid sodný. Symptomy nadměrné expozice azidem sodným zahrnují poškození kůže a očí a poškození sliznic a horních cest dýchacích. Koncentrace azidu sodného ve výrobku je 0,05 % a nenaplnuje tak kritéria OSHA pro nebezpečnou látku. Usazeniny NaN_3 mohou reagovat s olovem a mědí v potrubí a vytvářet vysoce explozivní azidy kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů v potrubí.²¹ U citlivých jedinců se mohou vyskytnout systémové alergické reakce.
- Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.

NÁVOD K POUŽITÍ

Jednotlivé kroky postupu

Primární protilátky Ventana byly vyvinuty za účelem použití v barvicích automatech Ventana ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím výrobce Ventana. Doporučené barvicí protokoly pro barvicí automaty jsou uvedeny v tabulce 1 a v tabulce 2. Parametry automatických postupů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v Návodu k obsluze. Některé parametry obsluhy barvicího automatu skliček jsou předem nastaveny výrobcem.

Tabulka 1. Doporučený barvicí protokol pro PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) s detekční soupravou MIEW DAB Detection Kit

Typ postupu	Platforma nebo metoda	
	NexES IHC	BenchMark Series
Odstraňování parafínu	V systému offline (manuální)	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	V systému offline (manuální), úprava buněk Cell Conditioning 1, 2 minuty, Decloaking Chamber, 120 °C	Cell Conditioning 1, standardní
Enzym (proteáza)	Není vyžadováno	Není vyžadováno
Protilátka (primární)	Asi 32 minut, 37 °C	Asi 32 minut, 37 °C
A/B Block (Blokování biotinu)	Vyžadováno	Vyžadováno
Kontrastní barvivo (hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing (modření), 4 minuty	Bluing (modření), 4 minuty

Tabulka 2. Doporučený barvicí protokol pro PATHWAY anti-HER-2/*neu* (4B5) s detekční soupravou *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Typ postupu	Platforma nebo metoda	
	NexES IHC	BenchMark Series
Odstraňování parafínu	-	Zvoleno
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	-	Cell Conditioning 1, standardní
Enzym (proteáza)	-	Není vyžadováno
Protilátka (primární)	-	Asi 16 minut, 37 °C
A/B Block (Blokování biotinu)	-	-
Kontrastní barvivo (hematoxylin)	-	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	-	Bluing (modření), 4 minuty

* *ultraView* Universal DAB není dostupná pro použití s PATHWAY HER2 (4B5) na automatu NexES IHC

Postupy barvení na barvicích automatech Ventana jsou následující. Další podrobné instrukce a další vlastnosti protokolu naleznete v Návodu k obsluze.

Barvicí automaty NexES IHC

Ruční odmaskování antigenu je potřebné, používáte-li barvicí automat NexES IHC.

- Parafín se ze skliček odstraňuje pomocí sérii xylenu a odstupňovaných alkoholů až po vodu a potom v lázni s puforem. Provést manuální odmaskování antigenu podle postupu níže a přenést sklička do roztoku APK Wash (1X).
- Založit primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebná přídavná činidla do přihrádky pro činidla a umístit je do barvicího automatu. Zkontrolovat nádoby na tekutiny a odpad.
- Vysušit barevné konce skliček a potom je opatřit štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, který má být proveden.
- Sklička zbarvená parafínem, po odmaskování antigenu, vyjmout z roztoku APK Wash (1X) a založit do barvicího automatu NexES IHC. Zamezit vysychání tkání.

Ruční postup odmaskování antigenu

Postup zhodnocení antigenu (úprava buněk), (pro sklička s tkáněmi barvenými na automatu NexES):

- Připravit komoru Decloaking Chamber k použití.

- Umístit misku do komory.
- Slícovat držadla nádoby s držadly komory. **POZNÁMKA:** Před umístěním misky do komory zkontrolujte, zda je její vnější povrch suchý. Pokud by byl vnější povrch misky vlhký, komora Decloaking Chamber bude vydávat rachotivý zvuk a voda v komoře bude mít za následek nesprávnou funkčnost komory.
- Naplnit misku 500 mL deionizované vody. Doprostřed misky umístíte tepelný štít (kruhová obrazovka). **Poznámka:** Tepelný kryt chrání plastové nádoby před zkroutením.
- Umístit každou barvicí nádobu Tissue-Tek, naplněnou 250 mL roztoku Cell Conditioning 1 Solution a příslušná sklička na tepelný kryt, který je umístěn uprostřed misky.
- Založit víko deklotační komory Decloaking Chamber a zajistit. (Slícovat šipku otevřeno s bílou tečkou na rukojeti misky. Uchopit rukojeť víka a otočit ve směru hodinových ručiček a místa uzavření. Jakmile je víko uzavřeno, odvodušňovací ventil sníží tlak na odvodušňovací trysce).
- Nastavit reostat na 10 a zajistit na místě (asi 120 °C).
- Zapnout deklotační komoru Decloaking Chamber a sledovat až tlak dosáhne 17-25 psi a až je teplota 120-125 °C. Jakmile teplota deklotační komory Decloaking Chamber dosáhne potřebné hodnoty, odměřit kalibračními ručními stopkami dobu 2 minut, dokud časovač deklotační komory Decloaking Chamber nedosáhne hodnot „reálného času“.
- Když je procedura úpravy buněk dokončena, vypnout deklotační komoru Decloaking Chamber. **POZNÁMKA:** Technici musí sledovat teplotní a tlakové podmínky, aby byly dodrženy potřebné specifikace. Jestliže dodrženy nejsou, je postup neplatný a cyklus se vzorky musí opakovat.
- Technici mohou sledovat klesající tlak pravidelnou kontrolou tlakoměru. Jakmile tlak klesne na 0 psi, deklotační komoru Decloaking Chamber lze nyní bezpečně otevřít. Otočte víko proti směru hodinových ručiček a pomalu odkryjte, abyste si neopáliili ruce.
- Vyjmout nádobu se skličky z misky a opatrně opláchnout deionizovanou vodou **POZNÁMKA:** Při odklopování víka buďte velmi opatrní, neboť povrch i kapalina jsou stále velmi horké.
- Jakmile je dokončeno oplachování, umístít sklička do stojanu na sklička Tissue-Tek naplněného deionizační vodou k provedení hydratace, než jsou sklička opatřena čárovým kódem. Jedno po druhém sklička vyjměte ze stojanu; vysušte matné konce a zkontrolujte, zda se tkáňové řezy během procesu nevysušily. Opatřete sklička příslušným štítkem a vrate je do nádoby na sklička. Opakovat tento postup se všemi skličky.
- Jakmile jsou všechna sklička opatřena čárovým kódem, vylijte deionizovanou vodu z nádoby na sklička a naplňte ji lázni 1X APK Wash. Sklička musí zůstat v tomto roztoku až do doby provedení barvicího cyklu. **POZNÁMKA:** Sklička se musí barvit během 4 hodin od provedení úpravy buněk. Během této doby je lze ponechat v promývacím roztoku, aby nedošlo k vysušení tkání.

Sériové barvicí automaty BenchMark Series

- Opatřete sklička štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protilátce, která má být zpracována.
- Založte primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebná přídavná činidla do přihrádky pro činidla a umístěte je do barvicího automatu. Zkontrolujte nádoby na tekutiny a odpad.
- Vložte sklička do barvicího automatu.

Pro všechny přístroje

- Spustit barvicí cyklus.
- Po dokončení cyklu vyjmout sklička z barvicího automatu.
- Umýt sklička vodným roztokem s obsahem jemného čistícího prostředku, aby se odstranil krycí roztok; dehydratovat, projasnit a pokrýt obvyklým způsobem permanentním montovacím médiem.
- Obarvená sklička by měla být hodnocena během dvou až tří dnů od barvení a jsou stabilní po dobu nejméně dvou let, jsou-li správně skladována při pokojové teplotě (15 až 25 °C).

Postupy kontroly kvality

Kontrolní buněčné linie

Společnost Ventana má k dispozici, jako zvláštní výrobek, čtyři kontrolní buněčné linie fixované ve formalínu, zalité v parafínu, nařezané a umístěné na nabitých podložních sklech (katalogové č. 781-2991). Kontrolní sklička PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides mohou být užitečná pro předběžné ověření použité metody zpracování pro barvení skliček protilátkou PATHWAY HER2 (4B5). Tyto čtyři kontrolní buněčné linie byly charakterizované hybridizací *in situ* na počet genových kopií. Pokud je příprava a barvení provedeno správným způsobem, buněčné linie by se měly zbarvit, jak je popsáno v

tabulce 4. Jestliže indikované zbarvení, zejména zbarvení s intenzitou 1+ a 2+, není zřejmé v příslušných jádrech, barvení tkání by mělo být opakováno.

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

Skóre HER2 IHC	Buněčná linie	Počet kopií genu HER2*
0	MCF-7	1,7
1+	T47D	2,9
2+	MDA-MB-453	5,2
3+	BT-474	18,9

*Průměr tří šarží kontrolních sklíček PATHWAY HER-2 4 in 1 control slides determinuje použití sondy PathVysion® HER2 Probe.

Tkáň pro pozitivní kontrolu

Tkáň pro pozitivní kontrolu, zpracovaná stejným způsobem jako vzorky pacienta se musí zpracovávat v každé sadě podmínek testování a v každém postupu barvení PATHWAY HER2. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo části tkáně a slouží jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní vzorky by měly být čerstvé fixované vzorky z pitvy, biopsie nebo operace zpracované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky analýzy, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechna činidla a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně. Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je vhodnější pro optimální kontrolu kvality a zjištění nižších úrovní degradace činidla, než tkáň se silně pozitivním zbarvením. Tkáň karcinomu prsu, o které je známo, že je slabě pozitivní je ideální kontrola, aby se zjistilo že, systém je citlivý na malá množství degradace činidel nebo, zda je problém v metodologii IHC. Neoplastická tkáň, která je pozitivní na HER-2/*neu* je však obvykle silně pozitivní, protože je patologické povahy (heperexpresie). Příkladem pozitivní kontroly pro PATHWAY HER2 (4B5) je známy, na HER-2/*neu* slabě pozitivní invazivní karcinom prsu (například duktální nebo lobulární). Komponenty tkání pro pozitivní kontrolu (cytoplazmatické membránové zbarvení neoplastických buněk) se používají k potvrzení, že protilátka byla aplikována a že přístroj pracuje správně.

Invazivní karcinom prsu, slabě pozitivní na HER-2/*neu*, může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo komponenty tkáně a slouží jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu.

Známe pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné účinnosti zpracovaných tkání a testovacích činidel, nikoliv jako pomůcka ke stanovení specifické diagnózy vzorků pacientů.

Tkáň pro negativní kontrolu

Stejná sklička, která se používají pro pozitivní kontrolu tkáně (duktální nebo lobulární invazivní karcinom prsu), lze použít jako negativní kontrolu tkáně. Části, které se nebarví (obklopující stroma, lymfoidní buňky a krevní cévy) by měly prokázat nepřítomnost specifického zbarvení a zajistit indikaci specifického zbarvení pozadí barvení s primární protilátkou. Podobně je normální prsní tkáň vhodná tkáň pro negativní kontrolu. Při každém barvicím cyklu použijte známou tkáň pro kontrolu zpracovanou, fixovanou a zalitou identickým způsobem jako vzorek (vzorky) pacienta, aby byla ověřena specifita protilátky PATHWAY HER2 (4B5) pro demonstraci HER-2/*neu* a aby se projevilo specifické zbarvení pozadí (falešně pozitivní zbarvení).

Činidlo pro negativní kontrolu

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s činidlem pro negativní kontrolu. Kontrola negativního činidla je použita místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení. Sklička je třeba obarvit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubační doba činidla pro negativní kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Nevysvětlitelné rozpory

Nevysvětlitelné rozpory v kontrolách by měly být ihned ohlášeny místnímu zastoupení společnosti Ventana. Pokud se výsledky kontrol neshodují se specifikacemi, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů tohoto letáku. Identifikovat a opravit problém a potom opakovat vzorek pacienta.

Ověření testu

Před prvním použitím protilátky nebo barvicího systému v diagnostické proceduře by měla být ověřena specifita protilátky testováním na řadě dostupných tkáních se známou

imunohistochemickou charakteristikou účinností, které představují známé pozitivní a negativní tkáň (seznamte se s Postupy kontroly kvality dříve popsané v této části příbalového letáku a s požadavky pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,¹⁵ a schválenou směrnicí CLSI Approved Guideline¹⁶ nebo s oběma dokumenty). Tyto postupy kontroly kvality musí být provedeny vždy, když se změně šarže protilátky nebo když se změně parametry testu. Vhodné pro ověření testu jsou tkáň rakoviny prsu se známým stavem HER2.

Interpretace výsledků

Imunologický postup barvení na automatech Ventana způsobuje hnědě zbarvený produkt reakce (DAB), vedoucí k sražení oblastí antigenu lokalizovaných primární protilátkou PATHWAY HER2 (4B5). Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog mající zkušenosti s imunohistochemickými postupy vyhodnotit kontroly a kvalitu barevných produktů.

Pozitivní kontroly

Nejprve je nutné provést test zbarvené tkáň pro pozitivní kontrolu a ověřit tak správnost funkce všech činidel. Přítomnost správně zbarveného reakčního produktu uvnitř membrány cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. V závislosti na délce inkubační doby a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvení bleděmodré až tmavomodré zbarvení buněčných jader. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

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

Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno testovat po tkáni pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specifitu značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkřížené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Barvení normálního prsu je odpovídající tkáni pro negativní kontrolu. Intaktní stromální a duktální části by se na membráně neměly barvit intenzivně, což indikuje, že se zbarvení neprojeví. Je-li tkáň barvena kontrastním barvivem, může být zbarvení v okolí buněk, tj. intersticiální prostory. Pokud se projeví specifické zbarvení ve tkáni pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Činidlo pro negativní kontrolu

Pokud se vyskytují nespecifické zbarvení, je většinou difúzní. Sporadické slabé zbarvení pojivové tkáň lze také pozorovat v řezech z tkání příliš fixovaných formalinem.

K interpretaci výsledků použijte intaktní buňky, protože nekrotické a degenerované buňky se často zbarvují nespecificky.

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta je nutno testovat jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí činidel pro negativní kontrolu. Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledky znamenají, že hledaný antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen. Ke správné interpretaci každého imunohistochemického výsledku by měla být testována rovněž morfologie každého vzorku tkáň s využitím řezů barvených hematoxylinem a eozinem. Morfologické nálezy pacientů a klinické údaje týkající se pacientů by měly být interpretovány kvalifikovaným patologem.

Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog mající zkušenosti s imunohistochemickými postupy vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly a kvalitu barevných produktů.

Obecné zásady interpretace barvení PATHWAY HER2 (4B5)

Karcinomy prsu, které jsou považovány za pozitivní na nadměrnou expresi proteinu HER-2 se musí shodovat v mezním kritériu pro intenzitu zbarvení (2+ nebo větší na stupnici 0 až 3+) a procentu pozitivních nádorových buněk (více než 10 %). Rovněž zbarvení se musí nacházet na buněčné membráně. Cytoplazmatické zbarvení může být také přítomno, ale toto zbarvení nedeterminuje pozitivitu. Ke stanovení intenzity zbarvení a determinaci kompletnosti cytoplazmatického membránového barvení je třeba zkoušet tři pole v době uchovaných a dobře zbarvených oblastí tkáň. Zbarvení, které obklopuje celou cytoplazmatickou membránu, by mělo být hodnoceno intenzitou „2+“ nebo „3+“. Částečné zbarvení membrány je třeba hodnotit jako „1+“. Rozhodujete-li případy mezi hodnotami „1+“ a „2+“, bude potřeba provádět hodnocení intenzit při zvětšení 400X nebo vyšším. Na rozdíl od případů hodnocených intenzitou 3+, zbarvení o intenzitě 2+ má méně zřetelný, jasně vykreslený kruh, zatímco případy vyhodnocené jako 3+ vykazují velmi zřetelnou konturu. Tabulka níže uvádí kritéria barvení pro rychlou orientaci. Více

informací a popis s fotografiemi zbarvení pomocí PATHWAY HER2 (4B5) naleznete v příručce Pravidla hodnocení podle stupnice společnosti Ventana.

Tabulka 4. Kritéria hodnocení intenzity zbarvení buněčné membrány pomocí PATHWAY HER2 (4B5)

Vzor zbarvení	Skóre (hlášení ošetřujícím lékařem)	Vyhodnocení zbarvení HER2
Nebylo pozorováno žádné membránové zbarvení	0	Negativní
Mírné, částečné zbarvení membrány	1+	Negativní
Slabé, celkové zbarvení membrány, více než 10 % rakovinových buněk	2+	Pozitivní
Intenzivní, celkové zbarvení membrány, více než 10 % rakovinových buněk	3+	Pozitivní

OMEZENÍ

Všeobecná omezení

- Imunohistochemie je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované vyškolení ve výběru vhodných činidel, výběru tkání, fixaci a zpracování; přípravě imunohistochemického podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
- Zbarvení tkáň závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, umývání, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, zachycení protilátky nebo falešně negativním výsledkům. Výsledky mohou být nekonzistentní v důsledku použití různých metod fixace a zalití, nebo v důsledku vnitřních nepravidlostí v tkáni.
- Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinického projevu, morfologie a jiných histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protilátky, činidla a použité metody. Barvení musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skel a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Ventana dodává protilátky a činidla pro použití optimálně naředěné, pokud jsou dodrženy instrukce, které jsou součástí produktu. Jakákoli odchylka od doporučených testovacích postupů může způsobit neočekávané výsledky. Je nutno provést a zdokumentovat příslušné kontroly. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
- Tento výrobek není určen k použití v průtokové cytometrii, neboť charakteristiky účinnosti nebyly stanoveny.
- Činidla mohou vykazovat neočekávané reakce v dříve netestovaných tkáních. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmě nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání.¹⁷ Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
- Tkáň osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenuvou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.¹⁸
- Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) a endogenní aktivitou peroxidázy (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu imunologického barvení.¹⁹
- Jako u každého imunohistochemického testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

Specifická omezení

- Protilátka byla optimalizována pro inkubační dobu v délce 32 minut ve spojení s detekčními soupravami Ventana /MIEW DAB a barvicími automaty Ventana.

- Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání může být potřeba zvýšit nebo snížit inkubační doby primární protilátky na jednotlivých vzorcích. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Principy a postupy imunohistochemie“.²⁰
- Protílátka ve spojení s detekčními soupravami a příslušenstvím Ventana detekuje antigen, který přežívá běžně provedenou fixací ve formalínu, zpracování tkáně a její nařezání. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, musejí za těchto okolností přijmout zodpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
 - Na specifitu byla testována kostní dřev. Dříve než budou interpretovány výsledky zabarvení, musí uživatel stanovit příslušné zabarvení ve tkáních.

SOUHRN OČEKÁVANÝCH VÝSLEDKŮ

Účinnost primární protilátky PATHWAY HER2 (4B5) byla hodnocena na základě specifity, reprodukovatelnosti a srovnávacích studií metod. Všechna zabarvení byla prováděna použitím detekčního protokolu N/IEU uvedeného výše na barvicím automatu BenchMark XT, není-li stanoveno jinak.

- Specifita:** Specifita protilátky PATHWAY HER2 (4B5) byla stanovena na základě studie, která neprokázala ve většině normálních tkání žádné specifické membránové zabarvení. Výsledky byly následující: nadledvina (0/3), prs (0/3), malý mozek (0/3), mozek (0/3), děložní hrdlo (0/3), tračník (0/3), jícen (1/3), srdce (0/2), ledvina (0/3), játra (0/3), plíce (0/3), mesotelální buňky (0/3), vaječník (0/3), slinivka břišní (0/3), příštítná žláza (1/3, fokální membránové zabarvení), periferní nerv (1/3), hypofýza (0/2), prostata (1/3), slinná žláza (0/3), skeletální sval (0/3), kůže (0/3), tenké střevo (0/3), slezina (0/3), žaludek (0/3), varlata (0/3), brzlík (0/2), štítná žláza (0/3), mandle (2/3 fokální zabarvení epitelálních buněk povrchu) a děloha (0/3). Specifita protilátky PATHWAY HER2 (4B5) byla též stanovena na základě studie, která neprokázala ve většině neoplastických tkání žádné specifické membránové zabarvení. Výsledky byly následující: rakovina prsu (1/4), karcinoid (0/2), rakovina tračníku (1/3), hepatocelulární rakovina (0/5), leiomyom (0/2), rakovina plic (0/2), lymfom (0/3), melanom (0/2), rakovina vaječníku (1/2), rakovina slinivky břišní (0/3), rakovina prostaty (0/3), rakovina renálních buněk (0/5), sarkom (0/2), rakovina žaludku (0/3), rakovina štítné žlázy (0/3) a nediferencovaná rakovina (0/1). Pozitivní zabarvení v epitelu mandlí, epitelu jícnu, prostatě, periferním nervu, příštítné žláze, rakovině prsu, tračníku a rakovině vaječníku jsou konzistentní s publikovanou literaturou týkající se exprese HER-2/neu.
- Senzitivita:** Senzitivita je závislá na konzervaci antigenu. Jakákoli nesprávná manipulace s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo uchování, která mění antigenicitu, zeslabuje detekci proteinu HER-2/neu pomocí PATHWAY HER2 (4B5) a může mít za následek falešně negativní výsledky.
- Reprodukovatelnost zabarvení v rámci cyklu na barvicích automatech NexES, BenchMark a BenchMark XT** byla stanovena na základě barvení tří sklíček, každé s tkáněmi pěti rakovin prsu s intenzitou exprese HER-2 0, 1+, 2+ a 3+. U každého případu, tři ze 3 sklíček, bylo v rámci cyklu a na všech testovaných platformách správně zabarvení. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků v rámci jednoho cyklu barvením různých setů sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v jednom cyklu.
- Reprodukovatelnost zabarvení mezi cykly** byla stanovena na základě barvení tří sklíček, každé s tkáněmi pěti rakovin prsu s intenzitou exprese HER-2 0, 1+, 2+ a 3+ ve třech různých cyklech napříč platformami NexES, BenchMark a BenchMark XT. U každého případu, devět z 9 sklíček, bylo ve všech třech cyklech a na všech testovaných platformách správně zabarvení. Uživatel musí ověřit reprodukovatelnost výsledků mezi cykly barvením různých setů sériových řezů s nízkou, střední a vysokou hustotou antigenu v různých dnech.
- Reprodukovatelnost barvení na automatu BenchMark XT mezi laboratořemi** a reprodukovatelnost hodnocení mezi hodnotiteli: Tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech amerických se podílely na studii potvrzení výsledků mezi laboratořemi. Sklíčka ze 40 případů invazivního karcinomu prsu, fixované v neutrálním pufovaném formalínu [Vždy 10 z každé kategorie HER-2 (0-1+, 2+, 3+)] a šest (6) kontrolních sklíček PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides bylo odesláno do všech míst k barvení na automatickém barvicím přístroji Ventana BenchMark XT za použití doporučeného barvicího protokolu. Kontroly zahrnovaly kontrolní sklíčka PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a druhé sklíčko vždy s případem barvením negativním Ig činidlem. Žádné místo nezaznamenalo neplatný cyklus, vycházelo se z účinnosti provedených kontrol. Výsledky byly analyzovány ve společnosti Ventana. Třicet čtyři ze čtyřiceti (34/40) sklíček vykazovalo ve všech místech srovnatelnou úroveň zabarvení. Šest případů (6/40 nebo 15 %) se lišilo ne více než o jednu úroveň. Tři (3/6) případy se lišily mezi 0 a 1+, což bylo v obou případech považováno za negativní. Dva případy (2/40 nebo 5 %) se lišilo mezi 2+ a 3+ a jeden případ (1/40) byl v rozmezí mezi 1+ a 2+.
- Reprodukovatelnost hodnocení mezi hodnotiteli:** U všech čtyřiceti případů (100 %) souhlasili s hodnocením minimálně 2 ze 3 patologů.

- Reprodukovatelnost mezi šaržemi** byla stanovena automatizovaným barvením 5 tkání karcinomu prsu s hodnotami úrovní exprese HER2 0, 1+, 2+ a 3+ se 3 šaržemi protilátky PATHWAY HER2 (4B5). Obarvené tkáně byly hodnoceny třemi kvalifikovanými hodnotiteli stupnicí 0 až 3+. Mezi hodnotiteli bylo dosaženo 100 % shody mezi šaržemi pro 3 sklíčka a 5 obarvených tkání.
- Srovnávací studie mezi králičí monoklonální protilátkou PATHWAY HER2 (4B5) a myší monoklonální protilátkou PATHWAY HER-2 (CB11):** Souhrn z provedených studií. Srovnávací studie metod byla provedena za účelem zjištění vzájemného vztahu protilátek PATHWAY HER2 (4B5) k PATHWAY HER-2 (CB11) a PathVysion Her-2 FISH, obou dříve schválených diagnostických testů FDA. Studie se účastnilo šest vědeckých pracovníků. Dvě skupiny třech různých pracovníků hodnotily dvě nezávislé skupiny (skupina 1: n=178, skupina 2: n=144), za použití známých případů karcinomu prsu barvených pomocí HER-2 CB11 a HER2 4B5. Údaje FISH byly získány z pacientovy anamnézy. Pro každou protilátku a pro každý případ bylo vytvořeno konsenzuální hodnocení z hodnocení tří pracovníků, aby se snížil vliv variability již známého hodnocení HER-2.^{22, 23, 24} Bylo hodnoceno celkem 322 případů. Sklíčka barvená pomocí PATHWAY HER-2 (CB11) byla zpracována a obarvena podle instrukcí výrobce uvedených v příbalovém letáku k Ventana CB11. Hodnocení barvených sklíček pomocí CB11 bylo provedeno v rozmezí asi jednoho roku od barvení. Jelikož hodnocení jednoho ze šesti hodnotitelů bylo mimo interval spolehlivosti, jsou údaje z těchto dvou skupin znázorněny následujícím způsobem:

Tabulka 5. Skupina 1 – konsenzuální hodnocení IHC tří patologů:

4B5	CB11			Celkem
	3	2	0, 1	
3	29	24	5	58
2	2	13	17	32
0, 1	0	0	53	53
Celkem	31	37	75	143

Skupina 1: Charakteristiky účinnosti pro prezentaci 3 x 3

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

Skupina 1: Charakteristiky účinnosti pro prezentaci 2 x 2 (protílátka HER-2 pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+) hodnocení se sloučila).

Procentuální shoda pozitivních je 29+2+24+13/31+37 = 100 % (95 % C.I. = 97,5 % - 100 %)

Procentuální shoda negativních je 53/75 = 70,7 % (95 % C.I. = 58,5 % - 80,1 %)

Celková shoda je 29+2+2+13+53/143=84,7 % (95 % C.I. = 78,2 % - 90,0)

Tabulka 6. Skupina 2 – konsenzuální hodnocení IHC tří patologů:

4B5	CB11			Celkem
	3	2	0, 1	
3	72	1	0	73
2	1	12	5	18
0, 1	0	7	80	87
Celkem	73	20	85	178

Skupina 2: Charakteristiky účinnosti pro prezentaci 3 x 3

Celková shoda je 72+12+80/178=92,1 % (95 % C.I. = 80,1 % - 93,1 %)

Skupina 2: Charakteristiky účinnosti pro prezentaci 2 x 2 (protílátka HER-2 pozitivní (2+ a 3+) a negativní (0+ a 1+) hodnocení se sloučila).

Procentuální shoda pozitivních je 72+12+1+1/73+20 = 92,5 % (95 % C.I. = 85,2 % - 96,9 %)

Procentuální shoda negativních je 80/85 = 94,1 % (95 % C.I. = 86,8 % - 98,1 %)

Celková shoda je 72+12+1+1+80/178=93,3 % (95 % C.I. = 88,5 % - 96,4 %)

Tabulka 7. Skupina 1 – konsenzuální hodnocení CB11 tří patologů metodou IHC oproti FISH:

CB11	FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3	32	0	32
2	32	5	37
0, 1	22	53	75
Celkem	86	58	144

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

Procentuální shoda pozitivních je $32+32/86=74,4\%$
(95 % C.I. = 63,8 % – 83,2 %)

Procentuální shoda negativních je $53/58=91,4\%$ (95 % C.I. = 80,9 % – 97,1 %)

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

Tabulka 8. Skupina 1 – konsenzuální hodnocení 4B5 tří patologů metodou IHC oproti FISH:

4B5	FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3	55	3	58
2	25	8	33
0, 1	6	47	53
Celkem	86	58	144

Skupina 1: Charakteristiky účinnosti pro 4B5 a FISH, prezentace 2 x 2 (kde hodnocení 2 a 3 jsou považována za pozitivní)

Procentuální shoda pozitivních je $55+25/86=93,0\%$
(95 % C.I. = 87,9 % – 96,3 %)

Procentuální shoda negativních je $47/58=81,0\%$ (95 % C.I. = 73,4 % – 86,0 %)

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

Tabulka 9. Skupina 2 – konsenzuální hodnocení CB11 tří patologů metodou IHC oproti FISH:

CB11	FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3	72	1	73
2	13	7	20
0, 1	8	77	85
Celkem	93	85	178

Skupina 2: Charakteristiky účinnosti pro CB11 a FISH, prezentace 2 x 2 (kde hodnocení 2 a 3 jsou považována za pozitivní)

Procentuální shoda pozitivních je $72+13/93=91,3\%$
(95 % C.I. = 85,0 % – 96,7 %)

Procentuální shoda negativních je $77/85=90,6\%$ (95 % C.I. = 83,9 % – 96,3 %)

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

Tabulka 10. Skupina 2 – konsenzuální hodnocení 4B5 tří patologů metodou IHC: porovnání k FISH

4B5	FISH		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
3	72	1	73
2	11	7	18
0, 1	10	77	87
Celkem	93	85	178

Skupina 2: Charakteristiky účinnosti pro 4B5 a FISH, prezentace 2 x 2 (kde hodnocení 2 a 3 jsou považována za pozitivní)

Procentuální shoda pozitivních je $72+11/93=89,2\%$
(95 % C.I. = 82,5 % – 95,1 %)

Procentuální shoda negativních je $77/85=90,6\%$ (95 % C.I. = 84,0 % – 96,4 %)

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

Reprodukovatelnost vzorků ze srovnávacích studií mezi jednotlivými patologiemi

Jelikož je dobře známo, že různí patologové mohou interpretovat imunohistochemická skříčka různě, byli použiti k hodnocení sklíček pro každou z těchto dvou skupin tři patologové (celkem tedy 6 patologů). K vyslovení konečného výsledku bylo použito pravidlo dva ze tří nesouhlasných výsledků. Níže je uveden souhrn výsledků získaných z hodnocení tří patologů ve srovnávací studii vzorků pro každou skupinu.

Tabulka 11. Skupina 1: Hodnocení intenzity 4B5 třemi patologiemi

	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
Skóre HER2	Skóre 4B5	Skóre 4B5	Skóre 4B5
3	72	70	73
2	22	19	18
0, 1	80	89	87
Celkem	174	178	178

Poznámka: Při hodnocení třemi patologiemi se 3 vzorky lišily o více než jeden stupeň úrovně (tj. 0, 2+).

Vzorek 1: Jeden patolog hodnotil jako 2+, dva patologové jako 0+.

Vzorek 2: Jeden patolog hodnotil jako 0+, dva patologové jako 2+.

Vzorek 3: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 1+ a třetí hodnotil jako 2+.

Tabulka 12. Skupina 1: Hodnocení intenzity CB11 třemi patologiemi

	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
Skóre HER2	Skóre CB11	Skóre CB11	Skóre CB11
3	72	75	73
2	22	22	18
0, 1	80	81	87
Celkem	174	178	178

Poznámka: Při hodnocení třemi patologiemi se 1 vzorek lišil o více než jeden stupeň úrovně (tj. 1 – 3+).

Vzorek 1: Jeden patolog hodnotil jako 1+, druhý jako 2+ a třetí hodnotil jako 3+.

Tabulka 13. Skupina 2: Hodnocení intenzity 4B5 třemi patologi

	Hodnotitel 4	Hodnotitel 5	Hodnotitel 6
Skóre HER2	Skóre 4B5	Skóre 4B5	Skóre 4B5
3	59	65	50
2	30	28	39
0, 1	52	51	55
Celkem	141	144	144

Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se 6 vzorků lišilo o více než jeden stupeň úrovně (tj. 0, 3+).

Vzorek 1: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 0+ a třetí hodnotil jako 2+

Vzorek 2: Jeden patolog hodnotil jako 1+, druhý jako 1+ a třetí hodnotil jako 3+

Vzorek 3: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 2+ a třetí hodnotil jako 2+

Vzorky 4 a 5: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 2+ a třetí hodnotil jako 2+

Vzorek 6: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 3+ a třetí hodnotil jako 3+

Tabulka 14. Skupina 2: Hodnocení intenzity CB11 třemi patologi

	Hodnotitel 4	Hodnotitel 5	Hodnotitel 6
Skóre HER2	Skóre CB11	Skóre CB11	Skóre CB11
3	31	37	28
2	38	32	47
0, 1	75	75	69
Celkem	144	144	144

Poznámka: Při hodnocení třemi patologi se 8 vzorků lišilo o více než jeden stupeň úrovně (tj. 0 – 2+).

Vzorky 1-6: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 1+ a třetí hodnotil jako 2+

Vzorky 7 a 8: Jeden patolog hodnotil jako 0+, druhý jako 2+ a třetí hodnotil jako 2+

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

Tabulka 15. Rozsahy shod 2X2* u tří patologi

	Všeobecná procentuální shoda	Pozitivní procentuální shoda	Negativní procentuální shoda
4B5 vs. CB11			
Skupina 1:	82,6 – 86,9 %	97,3 – 100,0 %	68,0 % – 75,4 %
Skupina 2:	88,2 – 95,5 %	87,6 – 95,6 %	86,1 – 95,4 %
4B5 vs. FISH			
Skupina 1:	86,8 – 88,2 %	90,7 – 94,2 %	79,3 – 81,0 %
Skupina 2:	87,4 – 89,9 %	88,2 – 90,0 %	84,5 – 91,8 %
CB11 vs. FISH			
Skupina 1:	79,9 – 84,0 %	73,3 – 80,2 %	89,7 – 89,7 %
Skupina 2:	84,8 % – 93,3 %	86,7 – 92,5 %	82,7 – 94,1 %

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

Závěr: Údaje z těchto studií prokázaly, že primární protilátka PATHWAY HER2 (4B5) byla specifická a reprodukovatelná ve své schopnosti lokalizovat příslušné membránové zbarvení v normálních a neoplastických tkáních. Údaje ze srovnání metod prokázaly, že primární protilátka PATHWAY HER2 (4B5) slouží jako pomůcka v hodnocení pacientů s rakovinou prsu, u kterých se uvažuje o léčbě přípravkem Herceptin®.

ŘEŠENÍ PROBLÉMU

- Jestliže vykazují pozitivní kontroly slabší zbarvení než je očekáváno, měly by být zkontrolovány během stejného cyklu na automatu další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních činidel.
- Je-li pozitivní kontrola negativní, je třeba zkontrolovat, zda má sklíčko štítek se správným čárovým kódem. Jestliže je sklíčko opatřeno správným štítkem, je třeba během stejného cyklu na automatu zkontrolovat další cykly s pozitivní kontrolou, aby se dalo stanovit, zda je to způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních činidel. Sběr, fixace nebo odstraňování parafinů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.
- Jestliže se nepodařilo odstranit všechny parafin, nemusí se barvení zdařit. Je třeba opakovat postup odstranění parafinu z tkání.
- Je-li zbarvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, opakujte cyklus s kratší inkubační dobou vždy o 4 minuty až do doby dosažení požadované intenzity barvení.
- Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní skla pozitivně nabita.
- Správné postupy naleznete v části Jednotlivé kroky postupu, návodu k obsluze k barvicímu automatu nebo kontaktujte místní zastoupení společnosti Ventana.

REFERENCE

- Akiyama, T. et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232: 1644-1646, 1986.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene *erbB-2* in human mammary tumour cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO* 6 : 605-610, 1987.
- Coons, A. H., and M. H. Kaplan. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91: 1-13, 1950.
- Nakane, P.K., and G.B. Pierce, Jr. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localizations of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 929-931, 1967.
- Hsu, S. M. et al. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981.
- Dickson, R. B. and Lippman, M. E. *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.* 17: 234-247, 1990.
- Herceptin (Trastuzumab) Package Insert. February 2005.
- Roche, P.C. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin. Proc.* 69: 57-58, 1994.
- 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.* 75: 1667-1673, 1997.
- Corbett, I. P. et al. NCL-4B5: 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.* 161: 15-25, 1990.
- Nicholson, R.I., et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. *Eur. J. Cancer.* 29A: 1018-1023, 1993.
- DePotter, C. R. et al. The expression of the *neu* oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology.* 15: 351-362, 1989.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2001.
- 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.

17. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
18. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 73(5): 626-32, 1980.
19. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
20. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
21. 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
22. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, 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.
23. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*, 1994;47:816-22.
24. Michael Bilous, M.A., M.B., Ch.B., F.R.C.P.A., Mitch Dowsett, Ph.D., Wedad Hanna, M.D., Jorma Isola, M.D., Ph.D., Annette Lebeau, M.D., Aberlardo Moreno, M.D., Frédérique Penault-Llorca, M.D., Ph.D., Josef Rüschoff, M.D., Gorana Tomasic, M.D., Marc van de Vijver, M.D., Ph.D. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol* 2003; 16:173-182.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

CONFIRM™, EZ Prep™, NIEW™, Liquid Coverslip™, *ultraView*™ a VIAS™ jsou ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc. PATHWAY®, BenchMark®, NexES® IHC, a Ventana® jsou registrované ochranné známky společnosti Ventana Medical Systems, Inc.

Superfrost™ je ochranná známka společnosti Erie Scientific Company.

Herceptin® je registrovaná ochranná známka Genentech, Inc.

PathVysion® je registrovaná ochranná známka Abbott Molecular.

Tissue-Tek® je registrovaná ochranná známka Sakura Finetek, Inc.

Permount® je registrovaná ochranná známka společnosti Fisher Scientific Company.

Ventana poskytuje kupujícímu jednorázovou licenci v souladu s následujícími patenty: Patent USA, č. 6045 759, 6192 945, 6416 713, 6945 128 a zahraniční stejnopisy. Další patenty jsou v schvalovacím řízení.

KONTAKTNÍ INFORMACE

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA

+1 520 887 2155

+1 800 227 2155 (USA)



www.ventanamed.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany