

Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis)

GE006

60 testów do stosowania w urządzeniu Dako Omnis

Spis treści

1.	Przeznaczenie.....	2
2.	Podsumowanie i wyjaśnienie.....	2
3.	Zasada procedury.....	2
4.	Dostarczane materiały.....	2
5.	Materiały wymagane, ale niedostarczane.....	3
6.	Materiały opcjonalne.....	3
7.	Środki ostrożności.....	3
8.	Przechowywanie.....	3
9.	Przygotowanie próbek.....	4
	9.1 Skrawki zatopione w parafinie.....	4
	9.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków.....	4
10.	Przygotowanie odczynników.....	4
11.	Procedura barwienia w systemie Dako Omnis.....	4
12.	Kontrola jakości.....	5
13.	Weryfikacja testu.....	5
14.	Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali w przypadku NSCLC.....	5
15.	Ocena tkanki.....	6
16.	Ograniczenia.....	7
	16.1 Ograniczenia ogólne.....	7
	16.2 Ograniczenia swoiste dla danego produktu.....	8
17.	Ocena skuteczności.....	8
	17.1 Ocena skuteczności nieklinicznej: tkanki prawidłowe i nowotworowe.....	8
	17.2 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: NSCLC.....	11
	17.3 Ocena skuteczności, nr kat. SK006 w porównaniu z nr. kat. GE006 / urządzenie Autostainer Link 48 w porównaniu z urządzeniem Dako Omnis: NSCLC.....	12
	17.4 Ocena skuteczności klinicznej.....	12
18.	Rozwiązywanie problemów.....	12
19.	Piśmiennictwo.....	13

Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis)

GE006

60 testów do stosowania w urządzeniu Dako Omnis

1. Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) jest jakościowym testem immunohistochemicznym wykorzystującym przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, który służy do wykrywania białka PD-L1 w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkankach raka niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC) z użyciem systemu wizualizacji EnVision FLEX w urządzeniu Dako Omnis.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali stopnia wybarwienia guza (ang. Tumor Proportion Score, TPS), która określa odsetek żywych komórek nowotworowych wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) jest narzędziem pomocniczym służącym do rozpoznawania pacjentów z NSCLC, którzy mają zostać poddani leczeniu produktem KEYTRUDA® (pembrolizumab) w monoterapii. Aby uzyskać informacje dotyczące wartości granicznych ekspresji PD-L1 podczas prowadzenia leczenia w szczególnych warunkach klinicznych, należy zapoznać się z etykietą produktu KEYTRUDA®.

2. Podsumowanie i wyjaśnienie

Wiązanie ligandów PD-1, PD-L1 i PD-L2 z receptorem PD-1 występującym na powierzchni komórek T hamuje proliferację komórek T i wytwarzanie cytokin. W przypadku niektórych guzów występuje zwiększona ekspresja ligandów PD-1, a sygnalizacja z udziałem tego szlaku może przyczynić się do hamowania czynnego nadzoru immunologicznego nad guzami przez limfocyty T. Produkt KEYTRUDA® (pembrolizumab) jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się z receptorem PD-1 i blokuje jego interakcję z białkami PD-L1 i PD-L2, powodując hamowanie odpowiedzi immunologicznej z udziałem szlaku PD-1, w tym przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. W modelach myszy syngenicznych zablokowanie aktywności PD-1 spowodowało zmniejszenie wzrostu guza (1).

3. Zasada procedury

Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) zawiera zoptymalizowane odczynniki i protokół wymagany do wykonania procedury barwienia IHC skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie w urządzeniu Dako Omnis. Po inkubacji z pierwotnym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko PD-L1 lub odczynnikiem Negative Control Reagent (NCR) próbki są inkubowane z przeciwciałem Linker swoistym dla gatunku gospodarza przeciwciała pierwotnego, a następnie poddawane inkubacji z gotowym do użycia odczynnikiem do wizualizacji, składającym się z cząsteczek przeciwciała wtórnego i cząsteczek peroksydazy chrzanowej sprzężonych z polimerowym szkieletem dekstranu. Konwersja enzymatyczna dodanego następnie chromogenu powoduje wytrącanie się osadu będącego widocznym produktem reakcji w miejscu występowania antygeny. Barwa reakcji chromogennej zmienia się w zależności od odczynnika wzmacniającego działanie chromogenu. Następnie próbkę można poddać barwieniu kontrastowemu i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki reakcji ocenia się przy użyciu mikroskopu do obserwacji metodą jasnego pola.

4. Dostarczane materiały

Wyszczególnione poniżej materiały są wystarczające do wykonania 60 testów (60 preparatów inkubowanych z przeciwciałem pierwotnym przeciwko PD-L1 i 60 preparatów inkubowanych z odpowiednim odczynnikiem do kontroli ujemnej). Odczynniki te są przeznaczone do stosowania w urządzeniu Dako Omnis. Dodatkowe informacje można znaleźć w podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

Objętość

Opis

1 x 12 mL

Przeciwciała pierwotne: Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3



Mysie przeciwciała monoklonalne (IgG₁) skierowane przeciwko PD-L1 w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.

1 x 12 mL

Kontrola ujemna



Kontrolne mysie przeciwciała monoklonalne (IgG₁) w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.

5. Materiały wymagane, ale niedostarczane

Urządzenie Dako Omnis (nr kat. G1100)
Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (Dako Omnis) (nr kat. GC807)
System wizualizacji EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) (nr kat. GV800) lub EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Dako Omnis) (nr kat. GV823)*
Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) (nr kat. GV805)
Odczynnik EnVision FLEX+ Mouse Linker (Dako Omnis) (nr kat. GV821)
Odczynnik EnVision FLEX DAB Enhancer (Dako Omnis) (nr kat. GC806)
Odczynnik Hematoxylin (Dako Omnis) (nr kat. GC808)
Środek czyszczący Clearify Clearifying Agent (GC810)
Kwas siarkowy Dako Omnis Sulfuric Acid, 0,3 M (nr kat. GC203)
Szkiełka nakrywkowe
Woda destylowana lub dejonizowana
Piec suszący umożliwiający utrzymanie temperatury 60°C lub niższej
Etanol absolutny i w stężeniu 95%
Mikroskop jasnego pola (powiększenie obiektywu 4–40x)
Środek do zatapiania i odczynniki pomocnicze wymagane do nałożenia szkiełek nakrywkowych: zalecane jest trwale zatapianie.
Tkanki wykazujące odczyn dodatni i ujemny do stosowania w charakterze prób kontrolnych (patrz część Kontrola jakości)
Szkiełka mikroskopowe: Dako FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus.
Ksylen, toluen lub substytutyksyleny
Stoper
Tkanki wykazujące odczyn dodatni i ujemny do stosowania w charakterze prób kontrolnych (patrz część Kontrola jakości w punkcie 12)

***UWAGA: do cieplnego odmaskowania antygenu (HIER) należy użyć roztworu EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), nr kat. GV805. Nie stosować roztworu EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), nr kat. GV804.**

6. Materiały opcjonalne

Preparaty kontrolne PD-L1 (nr kat. T1391)

7. Środki ostrożności

- 1) Do badań diagnostycznych in vitro.
- 2) Do stosowania przez wyszkolony personel.
- 3) Opisany produkt zawiera silnie toksyczny w czystej postaci związek chemiczny – azydek sodu (NaN_3). Azydek sodu (NaN_3) zastosowany w produkcji w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydków metali. Po usunięciu splukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydków metali w kanalizacji (2).
- 4) Przeciwciało pierwotne i odczynnik Negative Control Reagent zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego.
- 5) Próbkę przed i po utrwaleniu oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności (3).
- 6) Czasy inkubacji lub metody inne niż podane mogą przyczynić się do uzyskiwania błędnych wyników.
- 7) Odczynniki zostały optymalnie rozcieńczone. Dalsze rozcieńczanie może skutkować utratą zdolności barwienia antygenów.
- 8) Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.
- 9) Wyniki niewielkich badań wykazały podobne zakresy dynamiczne ekspresji PD-L1 w parach próbek guzów pierwotnych i przerzutowych NSCLC. Istnieje możliwość występowania różnic w ekspresji PD-L1 w guzach pierwotnych w porównaniu z przerzutowymi u tego samego pacjenta ze względu na fakt, że każdy guz ma unikatową heterogeniczność.
- 10) Zasadniczo zakazuje się pracy z produktem osobom poniżej 18. roku życia. Użytkownicy muszą być szczegółowo przeszkoleni w zakresie prawidłowych procedur postępowania, niebezpiecznych właściwości produktu i niezbędnych środków ostrożności. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.
- 11) W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
- 12) Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.
- 13) Na życzenie użytkowników profesjonalnych udostępniana jest Karta Charakterystyki Substancji.

8. Przechowywanie

Wszystkie elementy testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) należy przechowywać w oryginalnym opakowaniu w ciemnym miejscu i w temperaturze 2–8°C, gdy nie są używane w urządzeniu Dako Omnis. Podczas przechowywania korek każdej fiołki powinien być zamknięty.

Nie używać odczynnika po upływie daty ważności nadrukowanej na zewnętrznej powierzchni fiołki z odczynnikiem. Jeśli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane w ulotce dołączonej do opakowania, użytkownik musi je zweryfikować.

Stabilność w urządzeniu Dako Omnis

Zatwierdzona stabilność odczynnika w urządzeniu dla produktu o nr. kat. GE006 wynosi 120 godzin. Po zakończeniu barwienia należy wyjąć odczynniki z urządzenia Dako Omnis, zamknąć fiołki korkami i przechowywać w temperaturze 2–8°C. Informacje na temat stabilności w urządzeniu wszystkich elementów pomocniczych, takich jak rozcieńczone roztwory robocze buforu Wash Buffer i roztworu EnVision FLEX Target Retrieval Solution można znaleźć w odpowiednich instrukcjach użycia. Czas przebywania odczynników w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis; szczegółowe informacje można znaleźć w podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

9. Przygotowanie próbek

Z próbkami należy postępować w sposób umożliwiający zachowanie tkanki do barwienia IHC. W przypadku wszystkich próbek tkankowych należy stosować standardowe metody obróbki tkanek.

9.1 Skrawki zatopione w parafinie

Skrawki tkankowe utwalone w formalinie i zatopione w parafinie nadają się do użycia. Inne środki utwalające nie zostały zatwierdzone i mogą powodować błędne wyniki. Zaleca się 12–72 godz. utwalania w roztworze obojętnej buforowanej formaliny (NBF) o stężeniu 10%. Czasy utwalania ≤ 3 godzin mogą skutkować zróżnicowaną detekcją PD-L1. Próbki należy przygotować w formie bloczków o grubości 3 lub 4 mm utwalonych w formalinie, odwodnionych i oczyszczonych w serii kąpeli alkoholowych i ksylenowych, a następnie infiltrowanych płynną parafiną. Temperatura parafiny nie powinna przekraczać 60°C. Bloczki tkankowe utwalone w formalinie i zatopione w parafinie, które mają co najmniej 5 lat, mogą utracić immunoreaktywność PD-L1.

Próbki tkankowe należy pociąć na skrawki o grubości 4–5 µm. Po pocięciu tkanek na skrawki należy je umieścić na szkiełkach mikroskopowych Dako FLEX IHC (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus, a następnie umieścić na 1 godzinę w ciepłarnie w temperaturze 58°C ± 2°C.

9.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków

W celu zachowania antygenowości po osadzeniu skrawków tkankowych na szkiełkach należy je przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C. Skrawki należy wybarwić w ciągu 5 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze 25°C. Po osadzeniu preparatów należy je przechowywać i poddawać obróbce w temperaturze nieprzekraczającej 25°C, aby zachować integralność i antygenowość tkanek.

10. Przygotowanie odczynników

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) i bufor Wash Buffer (20x) należy rozcieńczyć do stężenia 1x zgodnie z ich instrukcjami użycia.

Odczynniki nie wymagają doprowadzenia do temperatury pokojowej przed załadowaniem do urządzenia. Należy je jednak załadować do urządzenia przed rozpoczęciem procedury barwienia, co zapewni wystarczającą ilość czasu na osiągnięcie temperatury pokojowej.

11. Procedura barwienia w systemie Dako Omnis

Uwagi dotyczące procedury

Użytkownik powinien przeczytać dokładnie niniejsze instrukcje i zapoznać się ze wszystkimi elementami oraz odnoszącymi się do nich środkami ostrożności przed użyciem urządzenia (patrz część Środki ostrożności).

Automatyczna procedura barwienia dla testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) obejmuje odparafinowanie skrawków tkankowych, odmaskowanie i barwienie. Preparaty są wyładowywane ze stacji wyładowywania na mokro. Wszystkie etapy protokołu zostały wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Omnis. Protokół „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx” jest przeznaczony do stosowania z przeciwciałem pierwotnym: Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, natomiast protokół „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent” – z odczynnikami Negative Control Reagent pasującym do izotypu. Dalsze informacje dotyczące umieszczania preparatów i odczynników w urządzeniu przedstawiono w podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

UWAGA: odczynniki i instrukcje opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników. Dodatkowe rozcieńczenie odczynników bądź nieprzestrzeganie czasu lub temperatury inkubacji może spowodować uzyskanie błędnych lub sprzecznych wyników. Stosowanie w laboratorium użytkownika innych niż opisane technik obróbki tkanek i procedur technicznych może spowodować unieważnienie wyników badania.

UWAGA: laboratoria znajdujące się w miejscach położonych na większych wysokościach nad poziomem morza powinny określić najlepszą metodę utrzymywania wymaganej temperatury (95–99°C) podczas odmaskowywania antygeny.

Procedura przed barwieniem

1. W oprogramowaniu stacji roboczej Dako Link Omnis wybrać protokół PD-L1 IHC 22C3 pharmDx lub Negative Control Reagent, który ma być zastosowany do każdego preparatu.
2. Upewnić się, że w oprogramowaniu DakoLink skonfigurowano drukowanie etykiet preparatów z widoczną nazwą protokołu.
3. Wydrukować etykiety preparatów i przykleić je do szkiełek podstawowych.
4. Umieścić preparaty w statywie na preparaty. W statywie na preparaty może znajdować się od jednego do pięciu preparatów.
5. Przed załadowaniem wszystkich wymaganych odczynników do modułu Reagent Storage Module upewnić się, że wszystkie przykrywkę korków fiolek są otwarte i zablokowane:
 - a. Przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, nr kat. GE006
 - b. Odczynnik Negative Control Reagent, nr kat. GE006
 - c. Odczynnik EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), nr kat. GV800 lub GV823
 - d. Odczynnik EnVision FLEX Visualization Reagent (Dako Omnis), nr kat. GV800 lub GV823
 - e. Bufor EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), nr kat. GV800 lub GV823
 - f. Odczynnik EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), nr kat. GV800 lub GV823
 - g. Odczynnik EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), nr kat. GV821
 - h. Odczynnik EnVision FLEX DAB Enhancer (Dako Omnis), nr kat. GC806
 - i. Opcjonalnie: Hematoxylin (Dako Omnis), nr kat. GC808 lub odczynnik równoważny
 - j. Kwas siarkowy Sulfuric Acid, 0,3 M, nr kat. GC203

6. Załadować statyw na preparaty do urządzenia Dako Omnis.
7. Upewnić się, że w urządzeniu Dako Omnis znajdują się butelki, i są w nim zarejestrowane. Płyny w butelkach:
 - a. Środek czyszczący Clearify Clearing Agent (nr kat. GC810)
 - b. Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution Low pH (nr kat. GV805) **rozcieńczony do stężenia roboczego 1x z użyciem wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej)**
 - c. Bufor Wash Buffer (nr kat. GC807) **rozcieńczony do stężenia roboczego 1x z użyciem wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej)**
8. Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym i dotknąć opcji „Gotowe”, aby rozpocząć procedurę barwienia.

Upewnić się, że stacja wyładowywania preparatów jest napełniona wodą o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowaną lub dejonizowaną).

Protokół barwienia

Protokoły „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx” i „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent” w urządzeniu Dako Omnis można monitorować z poziomu stacji roboczej Dako Link Omnis.

Preparaty należy barwić kontrastowo odczynnikiem Dako Hematoxylin (nr kat. GC808).

Procedura po barwieniu

Nie można dopuścić to wyschnięcia skrawków przed zatapianiem.

Zatapianie: zaleca się stosowanie bezwodnego, trwałego środka do zatapiania.

UWAGA: analizę odczynu można przeprowadzić w dogodnym momencie. Wybarwione preparaty należy przechowywać w ciemności.

12. Kontrola jakości

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) zostały poddane immunohistochemicznej kontroli jakości przy użyciu wymienionych powyżej procedur odmaskowania antygenu i barwienia. Odstępstwa od zalecanych w laboratorium procedur utrwalania, obróbki i zatapiania preparatów tkankowych mogą powodować istotne różnice w wynikach. W każdej procedurze barwienia należy wykonywać dodatkowo i ujemne tkankowe próby kontrolne. Te kontrole jakości mają zapewnić poprawność procedury barwienia z uwzględnieniem odczynników, przetwarzania tkanek i urządzenia. Zaleca się, aby próby kontrolne były barwione na tym samym szkiełku, co tkanka pacjenta. Aby wykryć prawidłowe utrwalenie antygenu, kontrolą dodatnią powinna być tkanka o dodatniej ekspresji biomarkera, utrwalona w ten sam sposób, co próbka badana. Wewnętrzne elementy dodatnie próbki badanej można służyć jako kontrole dodatnie. Kontrolą ujemną powinna być tkanka bez ekspresji biomarkera. Jeśli preparaty kontrolne nie zostaną utrwalone w ten sam sposób, co próbka badana, tkankę można użyć jedynie jako kontrolę barwienia. Preparaty do kontroli jakości przedstawiono w tabeli 3. Obejmują one wybarwioną metodą H&E próbkę tkanki pacjenta oraz zapewniane przez laboratorium dodatnie i ujemne próby kontrolne tkanek.

13. Weryfikacja testu

Przed pierwszym zastosowaniem systemu barwienia w ramach procedury diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować jakość testu. W tym celu należy wykonać testy z użyciem serii tkanek zapewnianych przez laboratorium o znanej charakterystyce odczynów IHC, odpowiadających tkankom o odczynie dodatnim i ujemnym. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości przedstawionymi w części Kontrola jakości powyżej. Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciał lub w przypadku zmiany parametrów testu. W tabeli 10 przedstawiono opcje rozwiązywania potencjalnych problemów, ich przyczyny oraz sugerowane działania korygujące.

14. Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali w przypadku NSCLC

Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać 100 żywotnych komórek guza.

Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu jasnego pola. Do oceny punktowej odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10–40x. W ocenie należy uwzględnić widoczny odczyn błonowy komórek guza.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali stopnia wybarwienia guza (ang. Tumor Proportion Score, TPS), która określa odsetek żywotnych komórek nowotworowych wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

$$TPS (\%) = \frac{\text{Liczba wybarwionych komórek z ekspresją PD-L1 (komórki nowotworowe)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100$$

Ocenie należy poddać częściowe lub całkowite wybarwienie błon komórkowych ($\geq 1+$), które różni się od odczynu cytoplazmatycznego. Odczyn cytoplazmatyczny należy traktować jako odczyn nieswoisty i pomijać go w ocenie nasilenia odczynu. Komórki prawidłowe i komórki immunologiczne związane z guzem, takie jak limfocyty naciekające czy makrofagi, *nie powinny* być uwzględniane w ocenie punktowej służącej do określenia ekspresji PD-L1.

W tabeli 1 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane/pomijane podczas określania stopnia wybarwienia guza.

Tabela 1. Kryteria uwzględniania/pomijania w ocenie TPS w przypadku NSCLC

Elementy tkankowe	Uwzględniany w ocenie TPS w przypadku NSCLC	Pomijany w ocenie TPS w przypadku NSCLC
Komórki nowotworowe	Przekonujący częściowy lub całkowity odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) u żywych komórek nowotworowych	Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu cytoplazmatycznego
Komórki układu immunologicznego	Nie uwzględniono	Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu komórek układu immunologicznego, takich jak: <ul style="list-style-type: none"> • jednojądrzaste komórki zapalne (duże limfocyty, monocyty, makrofagi płucne), • komórki osocza, • neutrofile.
Inne	Nie uwzględniono	Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu: <ul style="list-style-type: none"> • prawidłowych komórek sąsiadujących z komórkami nowotworowymi, • komórek zrębu (fibroblastów), • komórek martwiczych i/lub pozostałości komórkowych, • złogów czarnego barwnika pochodzącego od węgla.

Podczas każdej procedury barwienia tkanki należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 3 w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia tkanki. Podczas oceny ekspresji PD-L1 należy zbadać tkanki pacjenta wybarwione PD-L1 oraz odczynnikiem Negative Control Reagent (o ile jest stosowany) z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis). Próbkę wybarwioną z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty odczyn wynoszący $\leq 1+$.

Próbkę należy traktować jako wykazującą ekspresję PD-L1, jeśli w skali TPS $\geq 1\%$ żywotnych komórek guza wykazuje odczyn błonowy o dowolnym nasileniu. Próbkę należy traktować jako wykazującą wysoki poziom ekspresji PD-L1, jeśli w skali TPS $\geq 50\%$ żywotnych komórek guza wykazuje odczyn błonowy o dowolnym nasileniu (tabela 2).

Tabela 2. Status ekspresji PD-L1 na podstawie skali stopnia wybarwienia guza

Skala stopnia wybarwienia guza (TPS)			
Poziom ekspresji PD-L1	TPS < 1%	TPS $\geq 1\%$	TPS $\geq 50\%$
Stan ekspresji PD-L1	Brak ekspresji PD-L1	Ekspresja PD-L1	Wysoki poziom ekspresji PD-L1

Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx NSCLC Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx).

15. Ocena tkanki

Tabela 3. Zalecana kolejność oceny tkanek

Próbki	Uzasadnienie	Wymogi
1. Barwienie H&E (zapewniane przez laboratorium)	W pierwszej kolejności oceniany jest preparat wybarwiony hematoksyliną i eozyną (H&E) w celu określenia budowy histologicznej tkanki oraz jakości jej utrwalenia.	Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) i barwienie H&E należy przeprowadzić na kolejnych skrawkach pochodzących z tego samego bloczka parafinowego próbki. Próbki tkanek powinny być nienaruszone i dobrze utrwalone, a także odpowiadać rozpoznaniem typowi histologicznemu nowotworu.
2. Tkanica stanowiąca dodatnią próbę kontrolną (zapewniane przez laboratorium)	W następnej kolejności należy ocenić tkanki stanowiące dodatnią próbę kontrolną, wybarwione z użyciem pierwotnego przeciwciała przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent (opcjonalnie). Tkaniki te służą do weryfikacji skuteczności metody utrwalenia i procesu odmaskowania antygenu. Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania jakości badanych tkanek i odczynników testowych, a NIE pomocniczo do formułowania swoistych rozpoznań próbek pochodzących od pacjentów.	Próby kontrolne należy sporządzić z materiałów biopsyjnych/chirurgicznych pobranych z tych samych guzów, co próbki pacjenta, możliwie szybko utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w sposób analogiczny do próbki (próbek) pacjenta. Do interpretacji wyników barwienia należy wybierać jedynie próbki nienaruszone, ponieważ komórki nekrotyczne lub ulegające degeneracji często dają odczyn nieswoisty. Tkaniki wybrane jako dodatnie próby kontrolne powinny dawać podczas barwienia w kierunku PD-L1 odczyn dodatni o nasileniu słabym lub umiarkowanym, wskazujący na zdolność do wykrycia niewielkich zmian czułości testu.

		<p>Każda procedura barwienia powinna obejmować tkankę stanowiącą dodatnią próbę kontrolną, najlepiej na tym samym szkiełku, co tkanka pacjenta.</p> <p>Skrawki tkankowe wybarwione przeciwciałem pierwotnym przeciwko PD-L1: powinny być widoczne błony komórkowe wybarwione na brązowo. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Skrawki tkankowe wybarwione odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Jeżeli potwierdzenie dodatniego odczynu za pomocą tkanek do dodatniej próby kontrolnej nie powiedzie się, należy uznać wyniki badanych próbek za nieważne.</p>
<p>3. Tkanka stanowiąca ujemną próbę kontrolną (zapewniane przez laboratorium)</p>	<p>Następnie należy ocenić tkankę stanowiącą ujemną próbę kontrolną (niewykazującą ekspresji PD-L1) wybarwioną z użyciem przeciwciała pierwotnego przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent (opcjonalnie) w celu zweryfikowania swoistości znakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwotne.</p> <p>Fragmenty tkankowe dodatniej próby kontrolnej z odczynem ujemnym mogą służyć w charakterze ujemnej próby kontrolnej, lecz powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.</p>	<p>Próby kontrolne należy sporządzić z materiałów biopsyjnych/chirurgicznych pobranych z tych samych guzów, co próbki pacjenta, możliwie szybko utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w sposób analogiczny do próbki (próbek) pacjenta.</p> <p>Każda procedura barwienia powinna obejmować tkankę stanowiącą ujemną próbę kontrolną, najlepiej na tym samym szkiełku, co tkanka pacjenta.</p> <p>Skrawki tkankowe wybarwione przeciwciałem przeciwko PD-L1: brak odczynu błonowego w komórkach nowotworowych. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Skrawki tkankowe wybarwione odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Jeżeli tkanka stanowiąca ujemną próbę kontrolną wykazuje swoisty odczyn błonowy, wyniki próbki pacjenta należy uznać za nieważne.</p>
<p>4. Tkanka pacjenta wybarwiona z użyciem odczynnika Negative Control Reagent (opcjonalnie)</p>	<p>Próbki pacjenta wybarwione z użyciem odczynnika Negative Control Reagent z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) należy poddać analizie. Odczynnik Negative Control Reagent jest wykorzystywany zamiast przeciwciała pierwotnego i ułatwia interpretację swoistego odczynu w miejscu występowania antygenu.</p>	<p>Brak odczynu błonowego wskazuje na swoiste znakowanie antygenu docelowego przez przeciwciała pierwotne. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p>
<p>5. Tkanka pacjenta wybarwiona z użyciem przeciwciała pierwotnego przeciwko PD-L1</p>	<p>Próbki pacjenta wybarwione z użyciem przeciwciała pierwotnego przeciwko PD-L1 z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) należy poddać analizie jako ostatnie. Szczegółowe informacje dotyczące immunoreaktywności testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) zawierają części Streszczenie i informacje ogólne, Ograniczenia i Charakterystyka działania.</p>	<p>Ocenę nasilenia odczynu dodatniego należy przeprowadzać w kontekście każdego nieswoistego odczynu zaobserwowanego podczas procedury barwienia. W przypadku stwierdzenia braku nieswoistego odczynu zaleca się stosowanie w tej ocenie odczynnika Negative Control Reagent.</p> <p>Podobnie jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że nie wykryto antygenu, co nie znaczy, że nie był on obecny w analizowanych komórkach/tkankach.</p> <p>Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, musi ona zawierać 100 żywotnych komórek guza.</p>

16. Ograniczenia

16.1 Ograniczenia ogólne

- 1) Technika immunohistochemiczna jest wieloetapową metodą diagnostyczną wymagającą specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, tkanek, sposobu utrwalania i obróbki, przygotowania preparatu immunohistochemicznego oraz interpretacji wyników barwienia.
- 2) Odczyn tkankowy zależy od przygotowania i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, dzielenie na skrawki bądź zanieczyszczenie innymi tkankami lub cieczami może powodować powstawanie artefaktów, blokowanie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. niespójne wyniki mogą być spowodowane zmianami w zakresie metod utrwalania i zatapiania lub przez naturalne nieregularności w obrębie tkanek.

- 3) Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
- 4) Interpretacja kliniczna wystąpienia barwienia lub jego braku musi być prowadzona w kontekście objawów klinicznych, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna wystąpienia barwienia lub jego braku musi być uzupełniona o badania morfologiczne z wykorzystaniem odpowiednich prób kontrolnych i innych testów diagnostycznych. Odpowiedzialność za interpretację wybarwionych preparatów spoczywa na wykwalifikowanym patologu z doświadczeniem w zakresie stosowanych przeciwciał, odczynników i metod. Barwienie należy wykonać w certyfikowanym laboratorium pod nadzorem patologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów oraz właściwe wykonanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych.
- 5) Tkanki pochodzące od osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie w reakcji z peroksydazą chrzanową (4).
- 6) W typach tkanek, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można całkowicie wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji, nawet w przetestowanych typach tkanek, z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworowych i innych tkankach patologicznych. W przypadku uzyskania nieoczekiwanych reakcji należy przesłać odpowiednią dokumentację do działu wsparcia technicznego firmy Agilent.
- 7) Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Mogą one również wystąpić na skutek aktywności pseudoperoxydazy (erytrocyty) i endogennej peroksydazy (cytochrom C).
- 8) Odczynniki i instrukcje dostarczane z systemem opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników. Dalsze rozcieńczenie odczynników bądź zmiana czasów lub temperatur inkubacji może prowadzić do uzyskania błędnych lub niezgodnych wyników.
- 9) Preparaty oznaczone w dzienniku preparatów stacji roboczej Dako Omnis powinny być sprawdzone przez wykwalifikowany personel, patrz podstawowy podręcznik użytkownika Dako Omnis.
- 10) Prawidłowo przechowywany odczynnik zachowuje stabilność do terminu podanego na etykiecie. Nie należy używać odczynnika po upływie terminu ważności. Nieprawidłowe przechowywanie i stosowanie odczynników może prowadzić do uzyskania błędnych wyników.
- 11) Anulowanie preparatów oznacza, że podczas barwienia wystąpił poważny problem i nie należy ich stosować. Będzie wymagane ponowne barwienie preparatu. Dalsze szczegółowe informacje zawiera podręcznik użytkownika Dako Omnis.

16.2 Ograniczenia swoiste dla danego produktu

- 1) Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygeny w tkankach. Próbki powinny zostać wybarwione zgodnie z zaleceniami dotyczącymi przechowywania skrawków (patrz część 8).
- 2) W celu uzyskania optymalnych i powtarzalnych wyników skrawki tkankowe utrwalone w rutynowy sposób (w obojętnej buforowanej formalinie) i zatopione w parafinie wymagają wstępnego odmaskowania antygeny białka PD-L1 w urządzeniu Dako Omnis.
- 3) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) na tkankach utrwalonych za pomocą środków utrwalających innych niż formalina nie zostało zweryfikowane.
- 4) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) na próbkach pobranych metodą cienkoigłową nie zostało zweryfikowane.
- 5) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) na odwapnionych tkankach nie zostało zweryfikowane.

17. Ocena skuteczności

Dane dotyczące reaktywności (swoistości) tkanek prawidłowych i nowotworowych w części 17.1 pochodzą z danych dotyczących testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (SK006). Przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, można stosować w przypadku produktów o nr. kat. GE006 i SK006. Reaktywność tkankowa przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, nie jest zależna od urządzenia stosowanego w procedurze barwienia. Informacje na temat oceny skuteczności w zakresie czułości i precyzji względem tkanek NSCLC zawiera część 17.2.

Firma Dako przeprowadziła badanie porównawcze mające na celu ocenę skuteczności testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) (nr kat. GE006) w przypadku próbek FFPE NSCLC z użyciem testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (nr kat. SK006) w charakterze odniesienia. W badaniu tym wykazano równoważność skuteczności. Wyniki tego badania można znaleźć w części 17.3.

17.1 Ocena skuteczności nieklinicznej: tkanki prawidłowe i nowotworowe

Tkanki prawidłowe: w tabeli 4 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 w obrębie zalecanego panelu tkanek prawidłowych. Odczyn błonowy zaobserwowano w przypadku komórek układu immunologicznego oraz komórek pochodzenia nabłonkowego. Odczyn cytoplazmatyczny zaobserwowano w niektórych typach komórek, lecz nie zarejestrowano go jako odczynu dodatniego. Wszystkie tkanki zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie i wybarwione z użyciem zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis), zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w ulotce dołączonej do opakowania. W obrębie analizowanych typów komórek i tkanek nie uzyskano nieoczekiwanych wyników. Obserwowany odczyn był zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ekspresji PD-L1 IHC w tkankach prawidłowych (5, 6).

Tabela 4: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w tkankach prawidłowych

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy: elementy tkankowe	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny: elementy tkankowe	Odczyn nieswoisty
Grasica (3)	3/3 Nabłonek rdzenia	0/3	0/3
Gruzoł krokowy (2)	2/2 Nabłonek	0/2	0/2
Gruzoły sutkowe (3)	0/3	0/3	0/3
Jajniki (3)	0/3	0/3	0/3
Jądra (3)	0/3	0/3	0/3
Jelito cienkie (3)	0/3	0/3	0/3

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy: elementy tkankowe	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny: elementy tkankowe	Odczyn nieswoisty
Komórki międzybłonka (2)	0/2	0/2	0/2
Macica (3)	0/3	0/3	0/3
Mięsień sercowy (3)	0/3	0/3	0/3
Mięśnie szkieletowe (3)	0/3	0/3	0/3
Migdałki (3)	3/3 Nabłonek krypt migdałków 2/3 Centrum rozrodcze (makrofagi)	0/3	0/3
Mózg (3)	0/3	0/3	0/3
Mózdzek (3)	0/3	0/3	0/3
Nadnercza (3)	0/3	1/3 Komórki szpiku	0/3
Nerki (3)	1/3 Nabłonek kanalików	0/3	0/3
Nerwy obwodowe (3)	0/3	1/3 Tkanka łączna/naczynia	0/3
Okreźnica (3)	2/3 Makrofagi	0/3	0/3
Płuca (3)	3/3 Makrofagi pęcherzykowe	0/3	0/3
Przełyk (3)	0/3	0/3	0/3
Przysadka mózgowa (3)	1/3 Przedni płat przysadki 1/3 Tylny płat przysadki	1/3 Przedni płat przysadki 1/3 Tylny płat przysadki	0/3
Przystalce (3)	1/3 Nabłonek gruczołowy	0/3	0/3
Skóra (3)	0/3	0/3	0/3
Szypik kostny (3)	3/3 Megakariocyty	3/3 Megakariocyty	0/3
Szyjka macicy (3)	1/3 Nabłonek	0/3	0/3
Śledziona (3)	2/3 Makrofagi	0/3	0/3
Ślinianki (3)	0/3	0/3	0/3
Tarczycyca (3)	0/3	0/3	0/3
Trzustka (3)	0/3	0/3	0/3
Wątroba (3)	1/3 Makrofagi 1/3 Hepatocyty	0/3	0/3
Żołądek (3)	2/3 Limfocyty 1/3 Gruczoły żołądkowe	1/3 Gruczoły żołądkowe	0/3

Tkanki nowotworowe: w tabeli 5 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 w obrębie panelu tkanek nowotworowych. Odczyn błonowy zaobserwowano w przypadku komórek układu immunologicznego oraz komórek pochodzenia nabłonkowego. Odczyn cytoplazmatyczny zaobserwowano w niektórych typach komórek, lecz nie zarejestrowano go jako odczynu dodatniego. Wszystkie tkanki zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie i wybarwione z użyciem zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w ulotce dołączonej do opakowania. W obrębie analizowanych próbek guza nie zaobserwowano nieoczekiwanych wyników. Obserwowany odczyn był zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ekspresji PD-L1 IHC w tkankach nowotworowych (6-9).

Tabela 5: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w tkankach nowotworowych

Typ guza	Lokalizacja	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie N = 159
Chłoniak		
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek	Węzły chłonne	0/1
Chłoniak Hodgkina	Węzły chłonne	2/2
Chłoniak niezziarniczny	Węzły chłonne	1/1
Chłoniak rozlany z komórek B	Węzły chłonne	0/4
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek	Węzły chłonne	0/1
Chrzęstniakomięsak	Kości	0/1
Czerniak	Jama nosowa	0/1
	Odbytnica	0/1
Glejak	Mózg	0/1
Grasiczak	Śródpiersie	1/1
Guz chromochłonny	Nadnercza	0/1
Guz komórek wysp	Trzustka	0/1
Gwiaździak	Mózgowie	0/3
Kostniakomięsak	Kości	0/2

Międzybłoniak	Otrzewna	0/1	
Mięsak maziówkowy	Jama miednicy	0/1	
Mięśniakomięsak gładkokomórkowy	Pęcherz	0/1	
	Tkanki miękkie, ściana klatki piersiowej	0/1	
Mięśniakomięsak prążkowy	Gruzoł krokowy	0/1	
	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
	Tkanki miękkie, typ zarodkowy	0/1	
Nasieniak	Jądra	0/2	
Nerwiak zarodkowy	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
Nerwiakowłókniak	Tkanki miękkie, odcinek krzyżowy	0/1	
Oponiak	Mózg	0/2	
Prymitywny guz neuroektodermalny (PNET)	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
Rak	Jama nosowo-gardłowa; rak jamy nosowo-gardłowej	0/1	
Rak drobnokomórkowy	Płuca	0/1	
Rak gruczołowy	Głowa i szyja, podniebienie twarde	0/1	
	Gruzoł krokowy	0/5	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy in situ	0/2	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny	0/7	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny z przerzutami do węzłów chłonnych	0/1	
	Gruzoł ślinowy/ślinianka przyuszna	0/2	
	Jajniki	0/1	
	Jajniki, rak endometrioidalny	0/1	
	Jajniki, rak surowiczny	0/1	
	Jajniki, rak śluzowy	0/1	
	Jelito cienkie	0/2	
	Macica, rak endometrium	0/3	
	Macica, rak jasnokomórkowy	0/1	
	Odbytnica	0/4	
	Okreźnica	0/5	
	Okreźnica, przerzuty do wątroby	0/1	
	Okreźnica, rak śluzowy	0/1	
	Pęcherzyk żółciowy	1/5	
	Płuca	1/4	
	Przetyk	0/1	
	Przewód pokarmowy, przerzuty do płuc	0/1	
	Szyjka macicy, typ wewnątrzszyjkowy	0/1	
	Tarczycza, rak brodawkowy	0/3	
	Tarczycza, rak pęcherzykowo-brodawkowy	0/1	
	Tarczycza, rak pęcherzykowy	0/1	
	Trzustka	0/2	
	Trzustka, rak przewodowy	0/3	
	Wyrostek robaczkowy	0/1	
	Żołądek	0/6	
	Żołądek, rak śluzowy	0/1	
	Rak kory nadnerczy	Nadnercza	0/1
	Rak nerwowokomórkowy		
Rak brodawkowy	Nerka	0/1	
Rak jasnokomórkowy	Nerka	0/6	
Rak płaskonabłonkowy	Głowa i szyja	0/2	
	Macica	0/1	
	Płuca	1/2	
	Przetyk	0/7	
	Rak płaskonabłonkowy przetyku, przerzutowy do węzłów chłonnych	0/1	
	Skóra	0/2	
	Szyjka macicy	2/5	
Rak podstawnokomórkowy	Skóra	0/1	

Rak przejściowokomórkowy	Nerka	0/1
	Pęcherz	0/6
Rak rdzeniowy	Tarczycza	0/1
Rak wątrobowokomórkowy	Wątroba	0/5
Rak z komórek sygnetycznych	Okrężnica	0/1
	Rak okrężnicy z komórek sygnetycznych, przerzutowy do jajników	0/1
Rak z komórek śródmiąższowych	Jelito cienkie	0/1
	Odbytnica	0/1
	Okrężnica	0/1
Rak zarodkowy	Jądra	0/1
Rdzeniak	Mózg	0/1
Spermatocytoma	Jądra	0/2
Struniak	Jama miednicy	0/1
Wątrobiak zarodkowy	Wątroba	0/1
Wyściółczak	Mózg	0/1

17.2 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: NSCLC

Czułość analityczna: NSCLC

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 105 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek nowotworu niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC) w stadiach I–IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0–100% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0–3.

Dokładność: NSCLC

Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) na podstawie próbek NSCLC została oceniona w ośrodku firmy Dako. Średnią zgodność wyników ujemnych (ang. average negative agreement, ANA), średnią zgodność wyników dodatnich (ang. average positive agreement, APA) oraz zgodność wszystkich wyników (ang. overall agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej.

Tabela 6: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) zbadana w jednym ośrodku (TPS ≥ 1%)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami, pomiędzy dniami, pomiędzy partiami	TPS ≥ 1%	Każda z 32 próbek z NSCLC (16 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 16 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w każdym z trzech urządzeń Dako Omnis.	ANA 97,9% (95,0–100%) APA 97,9% (94,5–100%) OA 97,9% (94,8–100%)
W obrębie statywu (powtarzalność)	TPS ≥ 1%	Każda z 31 próbek z NSCLC (19 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednego statywu w urządzeniu Dako Omnis.	ANA 98,5% (95,5–100%) APA 97,4% (91,7–100%) OA 98,1% (94,2–100%)

ANA = średni odsetek zgodności wyników ujemnych, APA = średni odsetek zgodności wyników dodatnich, OA = całkowity odsetek zgodności, TPS = skala stopnia wybarwienia guza

Tabela 7: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) zbadana w jednym ośrodku (TPS ≥ 50%)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami, pomiędzy dniami, pomiędzy partiami	TPS ≥ 50%	Każda z 32 próbek z NSCLC (19 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w każdym z trzech urządzeń Dako Omnis.	ANA 99,1% (97,2–100%) APA 98,8% (96,2–100%) OA 99,0% (96,9–100%)
W obrębie statywu (powtarzalność)	TPS ≥ 50%	Każda z 31 próbek z NSCLC (21 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 10 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednego statywu w urządzeniu Dako Omnis.	ANA 97,6% (94,0–100%) APA 94,9% (85,9–100%) OA 96,8% (91,6–100%)

ANA = średni odsetek zgodności wyników ujemnych, APA = średni odsetek zgodności wyników dodatnich, OA = całkowity odsetek zgodności, TPS = skala stopnia wybarwienia guza

17.3 Ocena skuteczności, nr kat. SK006 w porównaniu z nr. kat. GE006 / urządzenie Autostainer Link 48 w porównaniu z urządzeniem Dako Omnis: NSCLC

Równoważność skuteczności testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Dako Omnis (GE006) w porównaniu z testem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (SK006) oceniono w ośrodku firmy Dako. Procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz zgodność wszystkich wyników (ang. overall agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej. W badaniach wykazujących 100% zgodności procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz zgodność wszystkich wyników (ang. overall agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności przy użyciu metody bootstrapowej dla wartości granicznych $TPS \geq 1\%$ i $\geq 50\%$.

Tabela 8: Badanie porównawcze testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (SK006) i PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) (GE006) z oceną przeprowadzoną przez trzech patologów w jednym ośrodku ($TPS \geq 1\%$).

Badanie porównawcze	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
SK006 w por. z GE006	$TPS \geq 1\%$	64 próbki NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC zostały wybarwione w urządzeniach Autostainer Link 48 (SK006) i Dako Omnis (GE006). Zestaw ten został oceniony trzykrotnie przez trzech różnych patologów.	NPA 99,0% (97,7–100%) PPA 98,5% (96,6–100%) OA 98,8% (97,7-99,7%)

NPA = odsetek zgodności wyników ujemnych; PPA = odsetek zgodności wyników dodatnich; OA = całkowity odsetek zgodności

Tabela 9: Badanie porównawcze testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (SK006) i PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako Omnis) (GE006) z oceną przeprowadzoną przez trzech patologów w jednym ośrodku ($TPS \geq 50\%$).

Badanie porównawcze	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
SK006 w por. z GE006	$TPS \geq 50\%$	64 próbki NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC zostały wybarwione w urządzeniach Autostainer Link 48 (SK006) i Dako Omnis (GE006). Zestaw ten został oceniony trzykrotnie przez trzech różnych patologów.	NPA 95,5% (92,9-97,8%) PPA 91,6% (85,3-96,6%) OA 93,7% (90,3-96,7%)

NPA = odsetek zgodności wyników ujemnych; PPA = odsetek zgodności wyników dodatnich; OA = całkowity odsetek zgodności

17.4 Ocena skuteczności klinicznej

Wszystkie badania kliniczne przeprowadzono z użyciem testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (SK006). Dane w części 17.3 stanowią dowód na równoważność skuteczności produktu o nr. kat. GE006 w porównaniu z produktem o nr. kat. SK006. Dane kliniczne zawiera instrukcja użycia produktu o nr. kat. SK006.

18. Rozwiązywanie problemów

Rozdział 10: Rozwiązywanie problemów

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak barwienia preparatów.	1a. Nadmierne ogrzewanie zatopionych skrawków tkankowych przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis może prowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności PD-L1.	1a. Skrawki tkankowe należy suszyć w temperaturze 58 +/-2 °C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu suszącym z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła.
	1b. Nieprawidłowe warunki przechowywania odczynników.	1b. Należy upewnić się, że odczynniki były przechowywane prawidłowo, w warunkach odpowiadających wymienionym.
2. Słabe nasilenie odczynu preparatów.	2a. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	2a. Należy upewnić się, że tkanka pacjenta nie była utrwalana zbyt krótko lub zbyt długo, bądź nie użyto innego środka utrwalającego.
	2b. Nadmierne ogrzewanie zatopionych skrawków tkankowych przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis może prowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności PD-L1.	2b. Skrawki tkankowe należy suszyć w temperaturze 58 +/- 2°C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu suszącym z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła.
	2c. Nieprawidłowe warunki przechowywania odczynników.	2c. Należy upewnić się, że odczynniki były przechowywane prawidłowo, w warunkach odpowiadających wymienionym.










	2d. Nieprawidłowe umieszczenie pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu w modułach barwienia.	2d. Sprawdzić umieszczenie pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu.
	2e. Uszkodzone pokrywy o zmiennym położeniu względem preparatu.	2e. Sprawdzić integralność pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu.
3. Nadmierny nieswoisty odczyn preparatów.	3a. Do mocowania skrawków do szkiełek użyto dodatków zawierających skrobię	3a. Unikać stosowania dodatków zawierających skrobię, zwiększających przyczepność skrawków do szkiełek mikroskopowych. Wiele dodatków wykazuje immunoreaktywność.
	3b. Wysychanie skrawków po procedurze barwienia.	3b. Sprawdzić, czy stacja wyładowywania jest napełniona wystarczającą ilością wody.
	3c. Doszło do wyschnięcia skrawków przed nałożeniem szkiełek nakrywkowych.	3c. Nie można dopuścić do wyschnięcia wybarwionych preparatów pomiędzy wyładowaniem z urządzenia Dako Omnis i nałożeniem szkiełek nakrywkowych.
	3d. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	3d. Upewnić się, że użyto właściwego utrwalacza. Alternatywne środki utrwalające mogą powodować nadmierny nieswoisty odczyn.
	3e. Niecałkowicie usunięta parafina.	3e. Sprawdzić wygląd złącza rozpuszczalnika. Szczegółowe informacje zawiera podstawowy podręcznik użytkownika Dako Omnis.
	3f. Nieswoiste wiązanie odczynników do tkanki.	3f. Sprawdzić próbkę pod kątem właściwej metody utrwalenia i/lub obecności martwicy.
	3g. Ponowne użycie paska do mieszania.	3g. Sprawdzić, czy użyto nowych pasków do mieszania.
4. Tkanka oddziela się od szkiełek.	4a. Zastosowano niewłaściwe szkiełka mikroskopowe.	4a. Stosować szkiełka FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus.
5. Nadmiernie silny odczyn swoisty.	5a. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	5a. Upewnić się, że stosowane są wyłącznie zatwierdzone środki utrwalające i metody utrwalania.

UWAGA: jeśli problemu nie daje się wyjaśnić żadną z powyższych przyczyn bądź zalecane działanie korekcyjne jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Agilent w celu uzyskania dalszej pomocy. Dodatkowe informacje na temat technik wykonywania odczynów i przygotowywania próbek można znaleźć we wspomnianym wcześniej podręczniku (10) (dostępnym w firmie Agilent), atlasie Atlas of Immunohistology (11) oraz publikacji Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis (12).

19. Piśmiennictwo

1. Keytruda® package insert.
2. 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." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2000.
4. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B s surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980; 73:626.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2000.
6. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. International Immunol 2007(19); 7:813.
7. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. J Immunol 2003;170:1257.11.
8. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Seliger CI, Kohonen-Cornish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer 2015; 89:181.
9. Chen B, Chapuy B, Ouyang J et al. PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. Clin Cancer Res 2013; 19:3462-3473.
10. Taylor CR and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2013.
11. Tubbs RR, Gephardt GN, Petras RE. Specimen processing and quality assurance. Atlas of immunohistology. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press; 1986:16
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press; 1986

Objaśnienia symboli

 REF	Numer katalogowy		Ograniczenie temperatury	 IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Producent	 LOT	Numer partii		Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <n> testów
	Zużyć przed		Sprawdzić w instrukcji obsługi	 EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.agilent.com

PT0020/Rev D

Wersja 2018.10