

SK005

50 testów do stosowania w urządzeniu Autostainer Link 48

Spis treści

1.	Przeznaczenie	2
2.	Podsumowanie i wyjaśnienie	2
2.1	Niepłaskonabłonkowa postać niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC)	2
2.2	Rak płaskonabłonkowy obszaru głowy i szyi (SCCHN)	2
2.3	Rak urotelialny (UC)	2
2.4	Czerniak	2
3.	Zasada procedury	3
4.	Dostarczane materiały	3
5.	Materiały wymagane, ale niedostarczane	4
6.	Środki ostrożności	4
7.	Przechowywanie	5
8.	Przygotowanie próbek	5
8.1	Skrawki zatopione w parafinie	5
8.2	Stosowanie odwapnionych tkanek	6
8.3	Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków	6
9.	Przygotowanie odczynników	6
10.	Procedura barwienia za pomocą urządzenia Autostainer Link 48	6
11.	Kontrola jakości	7
12.	Weryfikacja działania zestawu	7
13.	Interpretacja wybarwienia	7
13.1	Interpretacja wybarwienia: niepłaskonabłonkowy NSCLC	8
13.2	Interpretacja wybarwienia: rak płaskonabłonkowy obszaru głowy i szyi (SCCHN)	8
13.3	Interpretacja wybarwienia: rak urotelialny	8
13.4	Interpretacja wybarwienia: czerniak	8
14.	Ocena preparatu	8
15.	Ograniczenia	9
15.1	Ograniczenia ogólne	9
15.2	Ograniczenia swoiste dla danego produktu	10
16.	Ocena skuteczności nieklinicznej	10
16.1	Swoistość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx	10
16.2	Tkanki prawidłowe i nowotworowe	10
17.	Ocena skuteczności	12
17.1	Ocena skuteczności: niepłaskonabłonkowy NSCLC	12
17.2	Ocena skuteczności: SCCHN	16
17.3	Ocena skuteczności: UC	17
17.4	Ocena skuteczności: czerniak	18
18.	Rozwiązywanie problemów	21
19.	Piśmiennictwo	21

1. Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx jest jakościowym testem immunohistochemicznym wykorzystującym przeciwciała Monoclonal Rabbit Anti-PD-L1, Clone 28-8, który służy do wykrywania białka PD-L1 w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkankach niepłaskonabłonkowej postaci nowotworu niedrobnokomórkowego płuc (NSCLC), raka płaskonabłonkowego obszaru głowy i szyi (SCCHN), raka urotelialnego (UC) i czerniaka z użyciem systemu wizualizacji EnVision FLEX w urządzeniu Autostainer Link 48. Ekspresję białka PD-L1 definiuje się jako odsetek nadających się do analizy komórek guza wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnej intensywności, zgodnie z wytycznymi interpretacji wybarwienia swoistej dla rozpoznania typu histopatologicznego nowotworu.

Wskazanie guza*	Kliniczna wartość graniczna ekspresji PD-L1	Przeznaczenie
Niepłaskonabłonkowy NSCLC	≥ 1%, ≥ 5%, ≥ 10%	Ekspresja białka PD-L1 wykryta za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w tkankach niepłaskonabłonkowego NSCLC i SCCHN może wiązać się z dłuższym czasem przeżycia w wyniku leczenia produktem leczniczym OPDIVO® (niwolumab).
SCCHN	≥ 1%	
UC	≥ 1%	Ekspresja białka PD-L1 wykryta za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w tkankach raka urotelialnego może wiązać się ze zwiększonym wskaźnikiem odpowiedzi na produkt leczniczy OPDIVO®.
Czerniak	≥ 1%, ≥ 5%	Ekspresja białka PD-L1 wykryta za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w tkankach czerniaka może być pomocna w ocenie pacjentów, w przypadku których rozważane jest leczenie skojarzone z użyciem produktów leczniczych OPDIVO® (niwolumab) i YERVOY® (ipilimumab).

*Szczegółowe informacje na temat interpretacji barwienia można znaleźć w punkcie 13 ulotki dołączonej do produktu oraz odpowiednich dokumentach PD-L1 IHC 28-8 pharmDx Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx).

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 przyczyniać się do hamowania czynnego nadzoru immunologicznego nad guzami przez komórki T (1). OPDIVO® (niwolumab) jest przeciwciałem monoklonalnym będącym ludzką immunoglobuliną G4 (IgG4), które wiąże się z receptorem PD-1 i blokuje jego interakcję z ligandami PD-L1 i PD-L2, prowadząc do zniesienia hamowania z udziałem szlaku PD-1 odpowiedzi immunologicznej, w tym przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej (2). W modelach myszy syngenicznych zablokowanie aktywności PD-1 spowodowało zmniejszenie wzrostu guza (3). Korzyści kliniczne wynikające ze stosowania produktu leczniczego OPDIVO® i użyteczność kliniczną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono w przypadku NSCLC, SCCHN, UC i czerniaka.

2.1 Niepłaskonabłonkowa postać niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC)

Wykrycie w próbkach tkanki pacjenta z niepłaskonabłonkowym NSCLC komórek nowotworowych wykazujących ekspresję białka PD-L1 może wskazywać na większe korzyści dotyczące czasu przeżycia w wyniku stosowania u pacjenta produktu leczniczego OPDIVO® (niwolumab). Próbki pochodzące od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych z zastosowaniem produktu OPDIVO® sponsorowanych przez Bristol-Myers Squibb were tested using PD-L1 IHC 28-8 pharmDx. W badaniu klinicznym CA209057 zbadano zasadność kliniczną zastosowania testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx do oceny statusu ekspresji białka PD-L1 u pacjentów z niepłaskonabłonkowym NSCLC leczonych produktem leczniczym OPDIVO® (5, 11).

2.2 Rak płaskonabłonkowy obszaru głowy i szyi (SCCHN)

Wykrycie w próbkach tkanki SCCHN komórek nowotworowych wykazujących ekspresję białka PD-L1 może wskazywać na większe korzyści dotyczące czasu przeżycia w wyniku stosowania u pacjenta produktu leczniczego OPDIVO® (niwolumab). Próbki pochodzące od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych dotyczących produktu OPDIVO® sponsorowanych przez Bristol-Myers Squibb were tested using PD-L1 IHC 28-8 pharmDx. W badaniu klinicznym CA209141 zbadano zasadność kliniczną zastosowania testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx do oceny statusu ekspresji białka PD-L1 u pacjentów z SCCHN leczonych produktem leczniczym OPDIVO® (16).

2.3 Rak urotelialny (UC)

Wykrycie w próbkach tkanki UC komórek nowotworowych wykazujących ekspresję białka PD-L1 może wskazywać na większe korzyści dotyczące odpowiedzi na produkt leczniczy OPDIVO® (niwolumab) u takiego pacjenta. Z użyciem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx przebadano próbki pochodzące od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych dotyczących produktu leczniczego OPDIVO®, sponsorowanych przez firmę Bristol-Myers Squibb. W badaniu klinicznym CA209275 oceniano zasadność kliniczną zastosowania testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx do oceny statusu ekspresji białka L1 u pacjentów z UC leczonych produktem leczniczym OPDIVO®.

2.4 Czerniak

Antygen 4 związany z limfocytami cytotoksycznymi (ang. cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) to negatywny regulator aktywności limfocytów T. YERVOY® (ipilimumab) to przeciwciało monoklonalne, które wiąże się z antygenem CTLA-4 i blokuje jego interakcję z ligandami — CD80/CD86. Wykazano, że blokada aktywności antygeny CTLA-4 wzmacnia aktywację i proliferację limfocytów T, co przyczynia się do ogólnego wzrostu nasilenia przeciwnowotworowej odpowiedzi autoimmunologicznej (4).

PD-1 i CTLA-4 hamują przeciwnowotworową odpowiedź autoimmunologiczną poprzez mechanizmy uzupełniające i nieredundantne. Wykazano, że leczenie produktem leczniczym OPDIVO® w monoterapii i w skojarzeniu z produktem leczniczym YERVOY® zapewniało istotnie większe wydłużenie czasu przeżycia bez progresji choroby w porównaniu z produktem leczniczym YERVOY® stosowanym w monoterapii u nieleczonych wcześniej pacjentów z zaawansowanym czerniakiem (8–10).

Z użyciem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx przebadano próbki tkanek czerniaka pochodzące od pacjentów leczonych produktem leczniczym OPDIVO® w ramach badań klinicznych sponsorowanych przez firmę Bristol-Myers Squibb. W badaniu klinicznym CA209067 zbadano zasadność kliniczną zastosowania testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx do oceny statusu ekspresji białka PD-L1 u pacjentów z czerniakiem leczonych produktem leczniczym OPDIVO®, produktem leczniczym OPDIVO® w skojarzeniu z produktem leczniczym YERVOY® oraz produktem leczniczym YERVOY® w monoterapii.

OPDIVO® oraz YERVOY® to znaki handlowe należące do firmy Bristol-Myers Squibb.

3. Zasada procedury

Zestaw testowy PD-L1 IHC 28-8 pharmDx zawiera zoptymalizowane odczynniki i protokół wymagany do wykonania procedury barwienia IHC skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie z wykorzystaniem urządzenia Autostainer Link 48 oraz modułu do obróbki wstępnej PT Link (6). 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 chrozanowej 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. Interpretacja wyników odbywa się za pomocą mikroskopu świetlnego. W celu potwierdzenia prawidłowości serii odczynów dostarczono preparaty kontrolne zawierające dwie ludzkie linie komórkowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie.

4. Dostarczane materiały

PD-L1 IHC 28-8 pharmDx (nr kat. SK005)

Wyszczególnione poniżej materiały są wystarczające do wykonania 50 testów (50 preparatów inkubowanych z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko PD-L1 i 50 preparatów inkubowanych z odpowiednim odczynnikiem Negative Control Reagent; łącznie 100 preparatów). W zestawie dostarczane jest dodatkowe przeciwciało pierwotne skierowane przeciwko PD-L1, umożliwiające wybarwienie 15 preparatów kontrolnych linii komórkowych. Liczba testów zależy od zużycia 2 x 150 µL każdego odczynnika na preparat, z wyjątkiem roztworu DAB+ i Target Retrieval Solution.

Zestaw zawiera materiały wystarczające do wykonania maksymalnie 15 pojedynczych serii odczynów.

Objętość	Opis
1 x 34,5 mL	Odczynnik Peroxidase-Blocking Reagent PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT Roztwór buforowy zawierający nadtlenek wodoru, detergent i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 19,5 mL	Przeciwciało pierwotne: Monoclonal Rabbit Anti-PD-L1, Clone 28-8 MONOCLONAL RABBIT ANTI-PD-L1 CLONE 28-8 Królicze przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko PD-L1 w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 15 mL	Odczynnik Negative Control Reagent* NEGATIVE CONTROL REAGENT Kontrolne królicze przeciwciało monoklonalne IgG w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L. *Kontrolne królicze przeciwciało monoklonalne IgG jest sprzedawane na podstawie licencji uzyskanej od firmy Cell Signaling Technology.
1 x 34,5 mL	Przeciwciało LINKER, Anti-Rabbit LINKER, ANTI-RABBIT Mysie przeciwciało wtórne skierowane przeciwko immunoglobulinom króliczym w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 34,5 mL	Odczynnik Visualization Reagent-HRP VISUALIZATION REAGENT-HRP Dekstran sprzężony z cząsteczkami peroksydazy i cząsteczkami koziego przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i środek przeciwbakteryjny.
15 x 7,2 mL	Odczynnik DAB+ Substrate Buffer DAB+ SUBSTRATE BUFFER Roztwór buforowy zawierający nadtlenek wodoru i środek przeciwbakteryjny.
1 x 5 mL	Roztwór DAB+ Chromogen DAB+ CHROMOGEN Tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny w rozpuszczalniku organicznym.
1 x 34,5 mL	DAB Enhancer DAB ENHANCER Wodny roztwór siarczynu miedzi.

6 x 30 mL

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

Odczynnik EnVision FLEX
TARGET RETRIEVAL
SOLUTION LOW pH (50X)

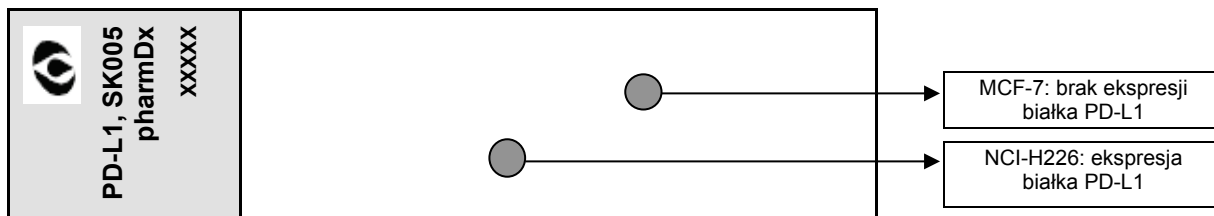
Roztwór buforowy, pH 6,1, zawierający detergent i środek przeciwbakteryjny.

15 preparatów

Preparaty kontrolne PD-L1 IHC 28-8 pharmDx

CONTROL SLIDES

Każdy preparat zawiera skrawki osadu dwóch linii komórkowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie: NCI-H226** wykazująca ekspresję białka PD-L1 (*pochodząca z ludzkich komórek raka płaskonabłonkowego płuca wykazujących ekspresję białka PD-L1*) i MCF-7 niewykazująca ekspresji białka PD-L1 (*pochodząca z ludzkich komórek raka gruczołowego sutka niewykazujących ekspresji białka PD-L1*).



** Dr AF Gazdar i dr JD Minna z NIH (ang. National Institute of Health, Krajowy Instytut Zdrowia) zyskali uznanie dzięki swojemu wkładowi w opracowanie linii komórkowych NCI-H226 (nr ATCC: CRL-5826™) (7)

Uwaga: wszystkie odczynniki w zestawie zostały opracowane specjalnie do stosowania z tym zestawem. Aby test działał prawidłowo, nie należy stosować substytutów innych niż roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (nr kat. K8005). Zestaw PD-L1 IHC 28-8 pharmDx jest przeznaczony do stosowania w urządzeniu Autostainer Link 48. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika urządzeń Autostainer Link 48 i PT Link.

5. Materiały wymagane, ale niedostarczane

Moduł do obróbki wstępnej PT Link Pre-treatment Module (nr kat. PT100/PT101/PT200)

Urządzenie Autostainer Link 48 (nr kat. AS480)

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (nr kat. K8007)

EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (nr kat. K8008)

Woda destylowana lub dejonizowana (woda o jakości odpowiedniej dla odczynników)

Stoper

Tkanki wykazujące odczyn dodatni i ujemny do stosowania jako kontrole procesu (patrz rozdział Kontrola jakości i tabela 5)

Preparaty mikroskopowe: Dako FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub Fisherbrand Superfrost Plus z ładunkiem elektrostatycznym

Szkiełka nakrywkowe

Środek do trwałego zatapiania i odczynniki pomocnicze wymagane do nałożenia szkiełek nakrywkowych

Mikroskop świetlny (obiektyw o powiększeniu 4–40x)

6. 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 – azyd sodu (NaN_3). NaN_3 zastosowany w produkcie w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydów metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydów metali w kanalizacji (12).
4. Przeciwciała pierwotne, odczynniki Negative Control Reagent, Linker i Visualization Reagent zawierają materiały 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 (13).
6. Czasy inkubacji, temperatury 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. Jakość odczynników Visualization Reagent, Liquid DAB+ Chromogen i roztworu roboczego DAB+ Substrate-Chromogen może ulec pogorszeniu pod wpływem nadmiernej ekspozycji na światło. Nie należy przechowywać elementów urządzenia ani przeprowadzać barwienia w miejscach silnie naświetlonych, np. w bezpośrednim świetle słonecznym.
9. Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.
10. Zastosowanie objętości odczynników innych niż zalecane może skutkować utratą widocznej immunoreaktywności PD-L1.
11. Duże skrawki tkankowe zajmujące $\geq 2/3$ powierzchni szkiełka mogą wymagać zastosowania odczynnika w ilości 3 x 150 μL .
12. 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.
13. W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
14. Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi.
15. Na życzenie użytkowników profesjonalnych udostępniana jest Karta Charakterystyki Substancji.
16. W przypadku krajów spoza Unii Europejskiej zatwierdzone wskazania i wartości graniczne ekspresji pomocne w leczeniu zamieszczone są na lokalnych etykietach produktów OPDIVO® i YERVOY®.



Niebezpieczeństwo

Odczynnik DAB+ Substrate Buffer: zawiera imidazol.

H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne. Stosować ochronę oczu lub twarzy. Stosować odzież ochronną.
P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczności: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Niebezpieczeństwo

Odczynnik DAB+ Chromogen: zawiera tetrachlorowodorek 3,3-diaminobenzydyny.

H350	Może powodować raka.
H341	Podjeżdza się, że powoduje wady genetyczne.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne. Stosować ochronę oczu lub twarzy. Stosować odzież ochronną.
P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczności: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Ostrzeżenie

DAB Enhancer

H400	Działa silnie toksycznie na organizmy wodne.
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P273	Unikać uwalniania do środowiska.
P391	Zebrać wyciek.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Ostrzeżenie

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

H319	Działa drażniąco na oczy.
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P280	Stosować ochronę oczu lub twarzy.
P273	Unikać uwalniania do środowiska.
P264	Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P305 + P351 + P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.

Zawiera 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan. Może wywoływać reakcje alergiczne.

7. Przechowywanie

Wszystkie elementy zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, w tym preparaty kontrolne, należy przechowywać w oryginalnym opakowaniu w ciemnym miejscu w temperaturze 2–8°C, gdy nie są używane w urządzeniu Autostainer Link 48.

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

Nie ma wyraźnych oznak wskazujących na niestabilność produktu, dlatego równoległe z odczynnikami na materiale pochodzącym od pacjentów należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne.

8. 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.

8.1 Skrawki zatopione w parafinie

Skrawki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie nadają się do użycia. Zalecany schemat postępowania i warunki obróbki to: czas niedokrwienia nieprzekraczający 30 minut przed zanurzeniem w środku utrwalającym i utrwalenie przez 24–48 godzin w roztworze obojętnej buforowanej formaliny o stężeniu 10%. Inne środki utrwalające nie zostały zatwierdzone i mogą powodować błędne wyniki. Próbki należy przygotować w formie bloczków o grubości 3 lub 4 mm utrwalonych w roztworze obojętnej buforowanej formaliny o stężeniu 10%, odwodnionych i oczyszczonych w serii kąpeli alkoholowych i ksylenowych, a następnie infiltrowanych płynną parafiną. Temperatura parafiny nie powinna przekraczać 60°C.

8.2 Stosowanie odwapnionych tkanek

Stosowanie testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx na odwapnionych tkankach nie zostało zatwierdzone i nie jest zalecane.

8.3 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków

Próbki tkankowe należy pociąć na skrawki o grubości 4–5 µm. Po podzieleniu tkanek na skrawki należy je osadzić na szkiełkach mikroskopowych Fisherbrand Superfrost Plus z dodatkiem ładunkiem elektrostatycznym lub Dako FLEX IHC (nr kat. K8020), a następnie umieścić na 1 godzinę w cieplarni w temperaturze 58°C ± 2°C. W celu zachowania antygenowości po osadzeniu skrawków tkankowych na szkiełkach należy je przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C oraz wybarwić je w ciągu 4 miesięcy od podzielenia na skrawki. Po osadzeniu preparatów należy je przechowywać i poddawać obróbce w temperaturze nieprzekraczającej 25°C, aby zachować integralność i antygenowość tkanek.

9. Przygotowanie odczynników

Przed barwieniem należy przygotować następujące odczynniki:

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

Przygotować wystarczającą ilość roztworu 1x Target Retrieval Solution, Low pH, poprzez rozcieńczenie roztworu Target Retrieval Solution, Low pH (50x), w stosunku 1:50 wodą o jakości odpowiedniej dla odczynników; pH roztworu 1x Target Retrieval Solution powinno wynosić 6,1 ± 0,2. Jedna butelka 30 mL roztworu Target Retrieval Solution, Low pH (50x), rozcieńczonego w stosunku 1:50 daje 1,5 L roztworu 1x, co wystarcza do napełnienia jednego zbiornika urządzenia PT Link i analizy 24 preparatów. Roztwór 1x Target Retrieval Solution należy zutylizować po trzech użyciach i nie należy używać go po upływie więcej niż 5 dni od rozcieńczenia.

Jeśli jest to wymagane, dostępny jest również dodatkowy roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), nr kat. K8005.

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

Przygotować wystarczającą ilość buforu Wash Buffer poprzez rozcieńczenie buforu Wash Buffer (20x) w stosunku 1:20 wodą o jakości odpowiedniej dla odczynników do etapów płukania. Niewykorzystany roztwór 1x należy przechowywać w temperaturze 2–8°C nie dłużej niż jeden miesiąc. W przypadku zmętnienia bufor nie nadaje się do użycia. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika urządzenia Autostainer Link 48.

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x) jest dostępny pod nr kat. K8007.

Roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution

Roztwór należy dokładnie wymieszać przed użyciem. Wytrącanie się osadu w roztworze nie wpływa na jakość barwienia.

Aby przygotować roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution, należy dodać 1 kroplę odczynnika Liquid DAB+ Chromogen na mL buforu DAB+ Substrate Buffer i wymieszać. Przygotowany odczynnik Substrate-Chromogen pozostaje stabilny przez 5 dni, jeśli jest przechowywany w ciemności w temperaturze 2–8°C.

Ważne uwagi:

- W przypadku używania całej butelki buforu DAB+ Substrate Buffer należy dodać 9 kropeł roztworu DAB+ Chromogen. Widniejąca na etykiecie informacja 7,2 mL oznacza objętość do wykorzystania i nie stanowi części objętości martwej butelki.
- Roztwór Liquid DAB+ Chromogen w butelce może przyjmować odcienie od przejrzystego do lawendowo-brązowego. Barwa roztworu nie wpływa na działanie produktu. Wykonywać rozcieńczenie zgodnie z wytycznymi przedstawionymi powyżej. Dodanie nadmiernej ilości roztworu Liquid DAB+ Chromogen do buforu DAB+ Substrate Buffer spowoduje osłabienie dodatniego odczynu.

10. Procedura barwienia za pomocą urządzenia Autostainer Link 48

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).

Przed przystąpieniem do barwienia immunohistochemicznego wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej (20–25°C). Wszystkie procedury inkubacji należy również przeprowadzać w temperaturze pokojowej.

W trakcie procedury barwienia nie wolno dopuścić do wyschnięcia skrawków tkankowych. Wyszuszone skrawki tkankowe mogą wykazywać nasilony nieswoisty odczyn.

Wszystkie wymagane kroki i czasy inkubacji procedury barwienia są wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Link. W celu uzyskania dalszych informacji na temat protokołów programowania, ładowania preparatów i odczynników należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika urządzeń Autostainer Link 48 i PT Link.

Uwaga: odczynniki i instrukcje dostarczane z systemem opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników podczas pracy z zalecanymi odczynnikami i materiałami. Dalsze rozcieńczenie odczynników bądź zmiana czasów lub temperatur inkubacji może prowadzić do uzyskania błędnych lub niezgodnych wyników.

Protokół barwienia

Należy wybrać protokół barwienia PD-L1 IHC 28-8 pharmDx z opcji w menu rozwijanym oprogramowania DakoLink.

Wszystkie wymagane kroki i czasy inkubacji procedury barwienia są wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu DakoLink. Jeśli na serwerze brakuje właściwych protokołów PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, należy skontaktować się z przedstawicielem działu wsparcia technicznego.

Krok 1: Procedura odparafinowania, ponownego nawodnienia i odmaskowania antygenu („3-w-1”)

Zalecana procedura:

Szczegółowe instrukcje zawiera podręcznik użytkownika urządzenia PT Link.

Ustawić w urządzeniu PT Link (nr kat. PT100/PT101/PT200) dla cyklu Preheat (Ogrzewanie wstępne) i Cool (Schładzanie) temperaturę 65°C. Dla cyklu Heat (Ogrzewanie) ustawić temperaturę 97°C i czas 20 minut.

- ▶ Napełnić każdy zbiornik urządzenia PT Link 1,5 L roztworu roboczego Target Retrieval Solution, Low pH, 1x, w celu pokrycia skrawków tkankowych.
- ▶ Ogrzać wstępnie roztwór Target Retrieval Solution do temperatury 65°C.
- ▶ Zanurzyć statywy urządzenia Autostainer zawierające skrawki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie we wstępnie ogrzanym roztworze roboczym Target Retrieval Solution, Low pH, (1x), znajdującym się w zbiorniku urządzenia PT Link. Inkubować przez 20 minut w temperaturze 97°C.
- ▶ Po zakończeniu inkubacji w roztworze do odmaskowania antygenu i spadku temperatury do 65°C należy wyjąć wszystkie statywy urządzenia Autostainer ze zbiornika PT Link i **natychmiast** umieścić je w zbiorniku (np. stacji PT Link Rinse Station, nr kat. PT109) zawierającym rozcieńczony bufor Wash Buffer (nr kat. K8007) o temperaturze pokojowej.
- ▶ Zostawić preparaty w rozcieńczonym buforze Wash Buffer o temperaturze pokojowej na 5 minut.

Krok 2: Procedura barwienia

Po wykonaniu procedury odparafinowania, nawodnienia i odmaskowania antygeny („3-w-1”) statywy urządzenia Autostainer umieszcza się w urządzeniu Autostainer Link 48. Sprawdzić, czy preparaty są zwilżone buforem podczas ładowania i przed rozpoczęciem serii. Urządzenie przeprowadza proces barwienia, dodając odpowiedni odczynnik, monitorując czas inkubacji i płucząc preparaty pomiędzy kolejnymi odczynnikami. Czasy zastosowania odczynników są wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Link.

Krok 3: Barwienie kontrastowe

Preparaty należy poddać barwieniu kontrastowemu w roztworze EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (nr kat. K8008) przez 7 minut. Czas inkubacji w hematoksylinie jest wstępnie zaprogramowany w protokole.

Etap 4: Zatapanie

Wymagany jest bezwodny środek do trwałego zatapania.

Uwaga: w zależności od kilku czynników, m.in. barwienia kontrastowego, materiałów i metod zatapania oraz warunków przechowywania preparatów, w miarę upływu czasu może dochodzić do blaknięcia wybarwionych preparatów. Aby zminimalizować to zjawisko, preparaty należy przechowywać w ciemności w temperaturze pokojowej (20–25°C).

11. Kontrola jakości

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx zostały poddane immunohistochemicznej kontroli jakości przy użyciu wymienionych powyżej procedur odmaskowania antygeny i barwienia. Odstępstwa od zalecanych w laboratorium procedur utrwalania, obróbki i zatapania preparatów tkankowych mogą powodować istotne różnice w wynikach. Każda seria barwienia powinna obejmować preparaty do kontroli jakości. Preparaty do kontroli jakości przedstawiono w tabeli 5. Obejmują one wybarwioną metodą H&E próbkę tkanki pacjenta, zapewnianie przez laboratorium dodatnie i ujemne próbki kontrolne tkanek oraz preparat kontrolny dostarczany przez firmę Dako (15). Na terenie USA należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi kontroli jakości programu College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Dodatkowe informacje zawiera również dokument CLSI Quality Assurance for Immunocytochemistry Approved Guideline (14).

12. Weryfikacja działania zestawu

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 wcześniej w tej części ulotki informacyjnej dołączonej do produktu. Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdego nowego zestawu lub w przypadku zmiany parametrów testu. W tabeli 22 przedstawiono opcje rozwiązywania potencjalnych problemów, ich przyczyny oraz sugerowane działania korygujące.

13. Interpretacja wybarwienia

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 5 w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia tkanki.

Dodatkowe wytyczne dotyczące oceny punktowej PD-L1 zawierają tabele interpretacji wybarwienia swoistej dla rozpoznania typu histopatologicznego nowotworu w niniejszym dokumencie oraz odpowiedni dokument PD-L1 IHC 28-8 pharmDx Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx).

Interpretacja barwienia z użyciem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx		
Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Podczas oceny barwienia immunohistochemicznego PD-L1 oraz oceny punktowej można wykorzystać obiektyw o powiększeniu 4x do wstępnej oceny całej próbki, a następnie obiektyw o powiększeniu 10–20x w celu określenia oceny punktowej (w razie potrzeby można wykorzystać powiększenie 40x w celu potwierdzenia). Obecność brązowego produktu reakcji (3,3'-diaminobenzydyny, DAB) wskazuje na wybarwienie białka PD-L1.		
Dodatni odczyn PD-L1 definiuje się jako barwienie obwodowe i (lub) częściowe liniowe błony komórkowej komórek guza o dowolnym nasileniu. Należy dokonać oceny całej próbki. Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. W wybarwionym w kierunku PD-L1 preparacie pacjenta musi znajdować się co najmniej 100 żywotnych komórek guza, aby możliwe było określenie odsetka wybarwionych komórek. Szczegółowe wytyczne zawierają odpowiednie sekcje dotyczące interpretacji barwienia zawarte w ulotce dołączonej do tego produktu.		
Odczyn cytoplazmatyczny, jeśli jest obecny, nie jest uwzględniany w ocenie punktowej. Komórki martwicze i pozostałości komórkowe nie są uwzględniane w ocenie. Odczyn PD-L1 może również występować w komórkach nienowotworowych i komórkach układu odpornościowego (np. naciekające limfocyty lub makrofagi), jednak tych komórek nie należy uwzględniać w ocenie punktowej służącej do określenia ekspresji PD-L1.		
Rozpoznanie	Dodatkowe uwagi dotyczące oceny punktowej	Poziom ekspresji PD-L1
Nieplaskonabłonkowy NSCLC	Nie dot.	≥ 1%, ≥ 5%, ≥ 10%
SCCHN	Komórki z ogniskami dysplazijnymi lub nowotworowymi <i>in situ</i> nie są uwzględniane w ocenie punktowej. Towarzyszące próbkom preparaty H&E umożliwiają prawidłową ocenę raka inwazyjnego, raka <i>in situ</i> i przyległego nabłonka prawidłowego.	≥ 1%
UC	Komórki z ogniskami dysplazijnymi lub nowotworowymi <i>in situ</i> nie są uwzględniane w ocenie punktowej. Towarzyszące próbkom preparaty H&E umożliwiają prawidłową ocenę raka inwazyjnego, raka <i>in situ</i> i przyległego nabłonka prawidłowego.	≥ 1%
Czerniak	Melaninę należy wykluczyć z oceny punktowej odczynu błonowego. W identyfikacji obecności melaniny i jej wykluczeniu pomocne może okazać się porównanie z kolejnym preparatem wybarwionym odczynnikiem NCR.	≥ 1%, ≥ 5%

13.1 Interpretacja wybarwienia: nieplaskonablonkowy NSCLC

Należy dokonać oceny całej próbki. Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. W wybarwionym w kierunku PD-L1 preparacie pacjenta musi znajdować się co najmniej 100 żywotnych komórek guza, aby możliwe było określenie odsetka wybarwionych komórek. W przypadku próbek nieplaskonablonkowego NSCLC należy zanotować odsetek żywotnych komórek guza wykazujących obwodowe i (lub) częściowe liniowe wybarwienie błony komórkowej w kierunku PD-L1 o dowolnym nasileniu.

13.2 Interpretacja wybarwienia: rak płaskonablonkowy obszaru głowy i szyi (SCCHN)

Test został zweryfikowany dla próbek tkankowych inwazyjnego SCCHN — nie dla zmian z ogniskami dysplazijnymi lub nowotworowymi *in situ*. Każdej próbce barwionej w kierunku PD-L1 powinny towarzyszyć preparaty barwione metodą H&E w celu umożliwienia prawidłowej oceny raka inwazyjnego i raka *in situ* oraz przyległego nabłonka prawidłowego.

Należy dokonać oceny całej próbki. Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. W wybarwionym w kierunku PD-L1 preparacie pacjenta musi znajdować się co najmniej 100 żywotnych komórek guza, aby możliwe było określenie odsetka wybarwionych komórek. W przypadku próbek SCCHN należy zanotować odsetek żywotnych komórek guza wykazujących obwodowe i (lub) częściowe liniowe wybarwienie błony komórkowej w kierunku PD-L1 o dowolnym nasileniu.

13.3 Interpretacja wybarwienia: rak urotelialny

Test został zweryfikowany dla próbek tkankowych inwazyjnego UC — nie dla zmian z ogniskami dysplazijnymi lub nowotworowymi *in situ*. Każdej próbce barwionej w kierunku PD-L1 powinny towarzyszyć preparaty barwione metodą H&E w celu umożliwienia prawidłowej oceny raka inwazyjnego i raka *in situ* oraz przyległego nabłonka prawidłowego.

Należy dokonać oceny całej próbki. Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. W wybarwionym w kierunku PD-L1 preparacie pacjenta musi znajdować się co najmniej 100 żywotnych komórek guza, aby możliwe było określenie odsetka wybarwionych komórek. W przypadku próbek UC należy zanotować odsetek żywotnych komórek guza wykazujących obwodowe i (lub) częściowe liniowe wybarwienie błony komórkowej w kierunku PD-L1 o dowolnym nasileniu.

13.4 Interpretacja wybarwienia: czerniak

Należy dokonać oceny całej próbki. Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. W wybarwionym w kierunku PD-L1 preparacie pacjenta musi znajdować się co najmniej 100 żywotnych komórek guza, aby możliwe było określenie odsetka wybarwionych komórek. Uważa się, że próbki wykazują ekspresję PD-L1 (odczyn dodatni), jeśli $\geq 1\%$ komórek czerniaka wykazuje obwodowe i (lub) częściowe liniowe wybarwienie błony komórkowej komórek guza w kierunku PD-L1 o dowolnym nasileniu. Uważa się, że próbki nie wykazują ekspresji PD-L1 (odczyn ujemny), jeśli $< 1\%$ komórek czerniaka wykazuje obwodowe i (lub) częściowe liniowe wybarwienie błony komórkowej komórek guza w kierunku PD-L1 o dowolnym nasileniu.

UWAGA: podczas interpretacji próbek od pacjentów z czerniakiem może występować brązowe zabarwienie wynikające z obecności melaniny. Melaninę należy wykluczyć z oceny punktowej odczynu błonowego; w identyfikacji obecności melaniny i jej wykluczenia pomocne może okazać się porównanie z kolejnym preparatem wybarwionym odczynnikiem NCR. Jeśli znacznie podwyższona zawartość melaniny uniemożliwia ocenę odczynu błonowego komórek nowotworowych, próbkę można wykluczyć z interpretacji i uznać za niemożliwą do oceny.

14. Ocena preparatu

Tabela 5: Zalecana kolejność oceny preparatów

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 28-8 pharmDx i barwienie H&E należy przeprowadzić na kolejnych skrawkach pochodzących z tego samego blozka parafinowego próbki. Próbki tkanek powinny być nienaruszone i dobrze utrwalone, a także odpowiadać rozpoznaniem typowi histologicznemu nowotworu.
2. Preparat kontrolny (dostarczany przez firmę Dako)	Najpierw należy poddać analizie preparat kontrolny wybarwiony przeciwciałem pierwotnym przeciwko PD-L1 z zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w celu ustalenia, czy wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Preparat kontrolny zawiera osad komórek z linii komórkowych wykazujących i niewykazujących ekspresji PD-L1.	Jeden preparat kontrolny należy wybarwić przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko PD-L1 w każdej serii odczynów. <i>Kryteria dopuszczalności NCI-H226 (linia komórek kontrolnych wykazująca ekspresję PD-L1, pochodząca z ludzkiej tkanki raka płaskonablonkowego płuca wykazującej ekspresję białka PD-L1):</i> <ul style="list-style-type: none">Wybarwienie błon komórkowych $\geq 80\%$ komórek o średnim nasileniu odczynu $\geq 2+$.Nasilenie odczynu nieswoistego $< 1+$. <i>Kryteria dopuszczalności MCF-7 (linia komórek kontrolnych niewykazująca ekspresji PD-L1, pochodząca z ludzkiej tkanki raka gruczołowego sutka niewykazującej ekspresji białka PD-L1)</i> <ul style="list-style-type: none">Brak odczynu swoistegoNasilenie odczynu nieswoistego $< 1+$. Niekiedy może dojść do wybarwienia kilku komórek z osadu komórek MCF-7. Zastosowanie mają następujące kryteria dopuszczalności: dopuszczalna jest obecność ≤ 10 komórek z wyraźnym odczynem błonowym lub odczynem cytoplazmatycznym o nasileniu $\geq 1+$ w obrębie osadu komórek MCF-7. Jeśli którakolwiek z kontrolnych linii komórkowych nie spełnia tych kryteriów, wszystkie wyniki próbek pacjenta należy uznać za nieważne.

Próbki	Uzasadnienie	Wymogi
3. Preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej (zapewniane przez laboratorium)	W następnej kolejności należy ocenić preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej wybarwione z użyciem pierwotnego przeciwciała przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent. Preparaty te służą do weryfikacji skuteczności metody utrwalania i procesu odmaskowania antygenu. Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania prawidłowego działania poddanych obróbce tkanek i odczynników testowych, a NIE pomocniczo podczas formułowania diagnozy pacjenta.	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 zdegradowane często dają odczyn nieswoisty. Tkanki 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. Każda seria odczynów powinna obejmować dwa preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej. Preparat wybarwiony przeciwciałem przeciwko PD-L1: powinny być widoczne błony komórkowe wybarwione na brązowo. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$. Preparat wybarwiony odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$. Jeżeli potwierdzenie dodatniego odczynu za pomocą dodatniej tkankowej próby kontrolnej nie powiedzie się, należy uznać wyniki badanych próbek za nieważne.
4. Preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej (zapewniane przez laboratorium)	Następnie należy ocenić preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej (niewykazujące ekspresji PD-L1) wybarwione z użyciem pierwotnego przeciwciała przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent w celu zweryfikowania swoistości znakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwotne. Fragmenty tkankowe dodatniej próby kontrolnej z odczynem ujemnym mogą służyć w charakterze ujemnej próby kontrolnej, lecz powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.	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. Każda seria odczynów powinna obejmować dwa preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej. Preparat wybarwiony przeciwciałem przeciwko PD-L1: brak odczynu błonowego w komórkach nowotworowych. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$. Preparat wybarwiony odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$. Jeżeli preparat tkankowy ujemnego preparatu kontrolnego wykazuje błonowy odczyn swoisty, wyniki próbki pacjenta należy uznać za nieważne.
5. Preparat tkankowy pacjenta wybarwiony z użyciem odczynnika Negative Control Reagent	Następnie należy poddać analizie próbki pacjenta wybarwione z użyciem odczynnika Negative Control Reagent z zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx. Odczynnik Negative Control Reagent jest wykorzystywany zamiast przeciwciała pierwotnego i ułatwia interpretację swoistego odczynu w miejscu występowania antygenu.	Brak odczynu błonowego wskazuje na swoiste znakowanie antygenu docelowego przez przeciwciała pierwotne przeciwko PD-L1. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.
6. Preparat tkankowy pacjenta wybarwiony z użyciem przeciwciała pierwotnego przeciwko PD-L1	Na końcu należy przeanalizować cały preparat próbki pacjenta wybarwiony przeciwciałem pierwotnym przeciwko PD-L1 z zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx. Szczegółowe informacje dotyczące immunoreaktywności testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx zawierają rozdziały Podsumowanie i wyjaśnienia, Ograniczenia i Ocena skuteczności nieklinicznej.	Ocenę nasilenia odczynu dodatniego należy przeprowadzać w kontekście każdego nieswoistego odczynu tła obecnego w preparatach z odczynnikiem Negative Control Reagent w obrębie tej samej serii. 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. Wytyczne interpretacji wybarwienia zawiera rozdział 13.

15. Ograniczenia

15.1 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 lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub cieczami może powodować

- powstawianie artefaktów, blokowanie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą być spowodowane zmianami w zakresie metod utrwalań i zatapiań lub przez naturalne nieregularności w obrębie tkanek.
- Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
 - 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 dodatkich i ujemnych prób kontrolnych.
 - 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 (17).
 - Nie można całkowicie wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji 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 Dako.
 - Przyczyną wyników fałszywie dodatnich może być wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne. Mogą one również wystąpić na skutek aktywności pseudoperoxydazy (erytrocyty) i endogennej peroksydazy (cytochrom c) (14).
 - 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.

15.2 Ograniczenia swoiste dla danego produktu

- Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygeny w tkankach. Po osadzeniu skrawków tkankowych na szkiełkach należy je przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C oraz wybarwić je w ciągu 4 miesięcy od podzielenia na skrawki. Po osadzeniu preparatów należy je przechowywać i poddawać obróbce w temperaturze nieprzekraczającej 25°C, aby zachować integralność i antygenowość tkanek.
- 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.
- Nie należy zastępować odczynników odczynnikami o innych numerach partii bądź pochodzącymi od innych producentów. Jedynym wyjątkiem jest roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), dostępny pod nr. kat. K8005.
- Wybarwione kontrolne linie komórkowe są przeznaczone tylko do weryfikacji serii odczynów i nie powinny być używane do oceny punktowej reakcji barwienia skrawków tkankowych.
- Stosowanie testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx na tkankach utrwalonych za pomocą środków utrwalających innych niż 10% roztwór obojętnej buforowanej formaliny nie zostało zweryfikowane.
- Na potrzeby badań klinicznych prowadzonych z wykorzystaniem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx za akceptowalne rodzaje próbek uznano próbki pobrane za pomocą biopsji wycięciowej, nacięciowej, sztanecowej lub gruboigłowej. Aspiraty z biopsji cienkoigłowej lub inne próbki cytologiczne były niewystarczające do analizy biomarkerów i zostały wykluczone z badań klinicznych prowadzonych z wykorzystaniem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx.

16. Ocena skuteczności nieklinicznej

16.1 Swoistość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx

Pierwotne przeciwciało w zestawie PD-L1 IHC 28-8 pharmDx to królicze przeciwciało monoklonalne (kłon 28-8) skierowane przeciwko ludzkiemu białku PD-L1. Immunogen wykorzystywany podczas wytwarzania przeciwciał to oczyszczone, rekombinowane ludzkie białko PD-L1, zawierające domenę zewnątrzkomórkową (Phe19–Thr239) ludzkiego białka PD-L1. Podczas barwienia IHC z użyciem pierwotnego przeciwciała przeciwko PD-L1 nie wykazano reaktywności krzyżowej w odniesieniu do białka PD-L2 ulegającego egzogennej ekspresji w komórkach jajnika chomika chińskiego (ang. chinese hamster ovary, CHO).

Test PD-L1 IHC 28-8 pharmDx umożliwia swoiste wykrycie ekspresji białka błonowego PD-L1 w komórkach nowotworowych w tkankach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Reakcję tę można całkowicie zahamować poprzez dodanie antygeny PD-L1. W przypadku zastosowania testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w odniesieniu do komórek nowotworowych pozbawionych genu PD-L1 w drodze inżynierii genetycznej białko błonowe PD-L1 nie jest wykrywane.

16.2 Tkanki prawidłowe i nowotworowe

W tabeli 6 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1 w obrębie zalecanego panelu tkanek prawidłowych. W tabeli 7 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Rabbit Anti-Human PD-L1 w tkankach nowotworowych z mikromacierzy tkankowych różnych nowotworów. Wszystkie tkanki zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie i wybarwione z użyciem zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w niniejszej ulotce dołączonej do opakowania. Test PD-L1 IHC 28-8 pharmDx umożliwia wykrycie białka PD-L1 w błonie komórkowej komórek, w których zachodzi ekspresja antygeny PD-L1, takich jak komórki układu odpornościowego i komórki pochodzenia nabłonkowego, głównie nowotworowe.

Tabela 6: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w tkankach prawidłowych

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy: Elementy tkankowe	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny: Elementy tkankowe
Grasica (3)	3/3 Nabłonek rdzenia	0/3
Gruczoł krokowy (3)	0/2*	0/2*
Gruczoły sutkowe (3)	0/3	0/3
Jajniki (3)	0/3	0/3
Jądra (3)	0/3	1/3 Komórki Leydiga
Jelito cienkie (3)	0/2*	0/2*
Komórki międzybłonka (3)	0/3	0/3
Macica (3)	0/3	0/3
Mięsień sercowy (3)	0/2*	0/2*
Mięśnie szkieletowe (3)	0/2*	0/2*
Migdałki (3)	3/3 Nabłonek krypt migdałków 3/3 Centrum rozrodcze (komórki układu immunologicznego)	0/3
Mózg (3)	0/3	0/3
Mózdzek (3)	0/3	0/3
Nadnercza (3)	3/3 Komórki szpiku	3/3 Komórki szpiku
Nerki (3)	3/3 Nabłonek kanalików	3/3 Nabłonek kanalików
Nerwy obwodowe (3)	0/3	0/3

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy: Elementy tkankowe	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny: Elementy tkankowe
Okrężnica (3)	2/3 Makrofagi	0/3
Płuca (3)	3/3 Makrofagi pęcherzykowe	0/3
Przełyk (3)	0/3	0/3
Przysadka mózgowa (3)	1/3 Przedni płat przysadki	1/3 Przedni płat przysadki 3/3 Tylne płat przysadki
Przytarczyce (3)	3/3 Nabłonek	0/3
Skóra (3)	0/3	1/3 Nabłonek
Szpik kostny (3)	3/3 Megakariocyty	3/3 Megakariocyty
Szyjka macicy (3)	1/3 Nabłonek	1/3 Nabłonek
Śledziona (3)	1/3 Makrofagi 3/3 Komórki brzeżne	0/3
Ślinianki (3)	0/3	0/3
Tarczycyca (3)	0/3	0/3
Trzustka (3)	3/3 Nabłonek (głównie komórki wysp)	3/3 Nabłonek (głównie komórki wysp)
Wątroba (3)	2/3 Komórki układu immunologicznego	2/3 Komórki układu immunologicznego
Żołądek (3)	0/3	0/3

* W jednej z trzech zbadanych dla tego typu tkanki próbek wykazano obecność artefaktów wynikających z wysychania tkanek lub silnego odczynu tła, co uniemożliwiło przeprowadzenie oceny punktowej. Wyniki uzyskane dla tej próbki nie zostały uwzględnione.

Tabela 7: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx w tkankach nowotworowych

Typ guza	Lokalizacja/narząd	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie (N = 162)
Chłoniak		
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek	Węzły chłonne	1/1
Chłoniak Hodgkina	Węzły chłonne	2/2
Chłoniak nieziarniczy	Węzły chłonne	1/1
Chłoniak rozlany z komórek B	Węzły chłonne	2/4
Czerniak	Jama nosowa	0/1
	Odbytnica	0/1
Glejak	Mózg	0/1
Grasiczak	Śródpiersie	1/1
Guz komórek wysp	Trzustka	0/1
Gwiaździk	Mózgowie	0/3
Międzybłoniak	Otrzewna	0/1
Mięsak		
Chrzęstniakomięsak	Kości	0/1
Kostniakomięsak	Kości	0/2
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
Rak jasnokomórkowy	Ściana jamy brzusznej	0/1
Tłuszczakomięsak	Jama brzuszna, rak śluzowy	0/1
Nasieniak	Jądra	0/2
Nerwiak zarodkowy	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1
Nerwiakowłókniak	Tkanki miękkie, odcinek krzyżowy	0/1
Oponiak	Mózg	0/2
Prymitywny nowotwór neuroektodermalny	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1
Rak	Jama nosowo-gardłowa; rak jamy nosowo-gardłowej	0/1
Rak drobnokomórkowy	Płuca	1/2
Rak gruczołowy	Głowa i szyja, podniebienie twarde	0/1
	Gruzoł krokowy	2/4
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy in situ	0/2
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny	3/7
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny z przerzutami do węzłów chłonnych	1/1
	Gruzoł ślinowy/ślinianka przyuszna	0/2
	Jajniki	0/1
	Jajniki, rak endometrioidalny	0/1
	Jajniki, rak surowiczy	0/1
	Jajniki, rak śluzowy	0/1
	Jelito cienkie	0/2
	Macica, rak endometrium	1/3
	Macica, rak jasnokomórkowy	1/1
	Odbytnica	2/4

Typ guza	Lokalizacja/narząd	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie (N = 162)
	Okreźnica	2/5
	Okreźnica, przerzuty do wątroby	1/1
	Okreźnica, rak śluzowy	0/1
	Pęcherzyk żółciowy	2/4
	Płuca	2/5
	Przełyk	1/1
	Przewód pokarmowy, przerzuty do płuc	0/1
	Rak oskrzelikowo-pęcherzykowy, płuca	0/1
	Szyjka macicy, typ wewnątrzszyjkowy	0/1
	Tarczycyca, rak brodawkowy	0/3
	Tarczycyca, rak pęcherzykowo-brodawkowy	0/1
	Tarczycyca, rak pęcherzykowy	0/1
	Trzustka	1/2
	Trzustka, rak przewodowy	0/3
	Wyrostek robaczkowy	1/1
	Żołądek	1/6
	Żołądek, rak śluzowy	0/1
Rak kory nadnerczy	Nadnercza	0/1
Rak nerkowokomórkowy		
Rak brodawkowy	Nerka	0/1
Rak jasnokomórkowy	Nerka	0/6
Rak płaskonabłonkowy	Głowa i szyja	0/2
	Macica	1/1
	Płuca	1/3
	Przełyk	4/7
	Rak płaskonabłonkowy przełyku, przerzutowy do węzłów chłonnych	1/1
	Skóra	1/2
	Szyjka macicy	2/4
Rak podstawnokomórkowy	Skóra	0/1
Rak przejściowokomórkowy	Nerka	0/1
	Pęcherz	3/6
Rak rdzeniowy	Tarczycyca	0/1
Rak wątrobowokomórkowy	Wątroba	1/5
Rak wielkokomórkowy	Płuca	1/1
Rak z komórek sygnetycznych	Okreźnica	0/1
Rak z komórek sygnetycznych	Rak okreźnicy z komórek sygnetycznych, przerzutowy do jajników	0/1
Rak z komórek śródmiąższowych	Jelito cienkie	0/1
Rak z komórek śródmiąższowych	Odbytnica	0/1
Rak z komórek śródmiąższowych	Okreźnica	0/1
Rak zarodkowy	Jądra	0/1
Rdzeniak zarodkowy	Mózg	0/1
Spermatocytoma	Jądra	0/2
Struniak	Jama miednicy	0/1
Tłuszczakomięsak	Jama brzuszna, rak śluzowy	0/1
Wątrobiak zarodkowy	Wątroba	0/1
Wyściółczak	Mózg	0/1

17. Ocena skuteczności

17.1 Ocena skuteczności: niepłaskonabłonkowy NSCLC

17.1.1 Czułość analityczna: niepłaskonabłonkowy NSCLC

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 112 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek niepłaskonabłonkowego NSCLC w stadiach I-IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0-100% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0-3.

17.1.2 Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzna: niepłaskonabłonkowy NSCLC

Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono odpowiednio w ośrodku firmy Dako oraz trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Uzyskane dane przedstawiono w tabelach 8 i 9. Określono procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) w oparciu o niezależne porównanie par testów dla każdego poziomu ekspresji PD-L1. Najczęściej występującą obserwacją zastosowaną jako punkt odniesienia w celu obliczenia NPA, PPA, OA oraz odpowiednich 95% przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona, dlatego jeden z wyników obserwacji został wykluczony z porównań par testów.

Tabela 8: Powtarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — nieplaskonablonkowy NSCLC

Powtarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)		
		Poziom ekspresji $\geq 1\%$	Poziom ekspresji $\geq 5\%$	Poziom ekspresji $\geq 10\%$
Pomiędzy urządzeniami	Każdą z 10 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w trzech powtórzeniach w każdym z trzech urządzeń Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 60 niezależnych porównań par.	NPA 100 (82,4; 100) PPA 100 (91,6; 100) OA 100 (94,0; 100)	NPA 100 (86,2; 100) PPA 100 (90,4; 100) OA 100 (94,0; 100)	NPA 100 (91,6; 100) PPA 100 (82,4; 100) OA 100 (94,0; 100)
Pomiędzy analitykami	Każdą z 12 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniło trzech analityków w trzech powtórzeniach w jednym urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 72 niezależnych porównań par.	NPA 100 (86,2; 100) PPA 100 (92,6; 100) OA 100 (94,9; 100)	NPA 100 (91,6; 100) PPA 100 (88,6; 100) OA 100 (94,9; 100)	NPA 100 (93,4; 100) PPA 100 (82,4; 100) OA 100 (94,9; 100)
Pomiędzy dniami	Każdą z 10 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w trzech powtórzeniach w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 80 niezależnych porównań par.	NPA 100 (86,2; 100) PPA 100 (93,6; 100) OA 100 (95,4; 100)	NPA 100 (89,3; 100) PPA 100 (92,6; 100) OA 100 (95,4; 100)	NPA 98,2 (90,6; 99,7) PPA 100 (86,2; 100) OA 98,8 (93,3; 99,8)
Pomiędzy partiami	Każdą z 20 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w dwóch powtórzeniach z użyciem każdej z pięciu partii odczynników w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 160 niezależnych porównań par.	NPA 100 (94,3; 100) PPA 100 (96,2; 100) OA 100 (97,7; 100)	NPA 100 (95,4; 100) PPA 100 (95,4; 100) OA 100 (97,7; 100)	NPA 100 (96,4; 100) PPA 100 (93,6; 100) OA 100 (97,7; 100)
W obrębie serii	Każdą z 10 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ośmiu powtórzeniach w obrębie serii w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 70 niezależnych porównań par.	NPA 100 (84,5; 100) PPA 100 (92,7; 100) OA 100 (94,8; 100)	NPA 100 (87,9; 100) PPA 100 (91,6; 100) OA 100 (94,8; 100)	NPA 100 (92,7; 100) PPA 100 (84,5; 100) OA 100 (94,8; 100)

Tabela 9: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — nieplaskonablonkowy NSCLC, ocena w trzech ośrodkach zewnętrznych

Odtwarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji $\geq 1\%$	Poziom ekspresji $\geq 5\%$
Analiza pomiędzy ośrodkami (trzy ośrodki)	Każdą z 10 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o niezależne porównanie łącznie 140 par.	NPA 100 (93,6; 100) PPA 98,8 (93,6; 99,8) OA 99,3 (96,1; 99,9)	NPA 91,4 (82,5; 96,0) PPA 97,1 (90,2; 99,2) OA 94,3 (89,1; 97,1)
Analiza w obrębie ośrodka	Każdą z 10 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o niezależne porównanie łącznie 120 par.	NPA 100 (92,6; 100) PPA 98,6 (92,5; 99,8) OA 99,2 (95,4; 99,9)	NPA 96,4 (87,9; 99,0) PPA 95,3 (87,1; 98,4) OA 95,8 (90,6; 98,2)
Pomiędzy obserwatorami (jeden obserwator w każdym z trzech ośrodków)	Ocena 15 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o niezależne porównanie łącznie 120 par.	NPA 96,9 (89,3; 99,1) PPA 100 (93,6; 100) OA 98,3 (94,1; 99,5)	NPA 100 (94,3; 100) PPA 89,3 (78,5; 95,0) OA 95,0 (89,5; 97,7)
W ramach obserwatora (jeden obserwator w każdym z trzech ośrodków)	Ocena 15 próbek nieplaskonablonkowego NSCLC o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o niezależne porównanie łącznie 90 par.	NPA 95,8 (86,0; 98,8) PPA 100 (91,6; 100) OA 97,8 (92,3; 99,4)	NPA 100 (93,1; 100) PPA 100 (90,8; 100) OA 100 (95,9; 100)

17.1.3 Ocena skuteczności klinicznej: niepłaskonabłonkowy NSCLC

Użyteczność kliniczną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono w randomizowanym badaniu fazy III CA209057, prowadzonym metodą otwartej próby, dotyczącym porównania stosowania niwolumabu i docetakselu u osób dorosłych (≥ 18 . roku życia) z zaawansowanym lub przerzutowym niepłaskonabłonkowym NSCLC po niepowodzeniu wcześniejszej chemioterapii dwuskładnikowej, opartej na związkach platyny. Randomizacji poddano łącznie 582 uczestników w 112 ośrodkach z 22 krajów (Argentyna, Australia, Austria, Brazylia, Kanada, Chile, Czecho, Francja, Niemcy, Hong Kong, Węgry, Włochy, Meksyk, Norwegia, Peru, Polska, Rumunia, Federacja Rosyjska, Singapur, Hiszpania, Szwajcaria i Stany Zjednoczone). Uczestników poddano randomizacji w stosunku 1:1, a także stratyfikacji z uwzględnieniem następujących czynników: 1) stosowanie lub niestosowanie wcześniejszego leczenia podtrzymującego oraz 2) chemioterapia w drugiej lub trzeciej linii. Przed randomizacją oraz podaniem pierwszej dawki leku (w punkcie początkowym) pobrano próbki tkanki nowotworowej w celu przeprowadzenia zaplanowanych wcześniej analiz dotyczących skuteczności na podstawie określonego wstępnie poziomu ekspresji PD-L1 w punkcie początkowym (cel drugorzędowy). Pierwszorzędnym punktem końcowym był całkowity czas przeżycia (ang. overall survival, OS). Innymi drugorzędnymi punktami końcowymi były: wskaźnik obiektywnych odpowiedzi (ang. objective response rate, ORR), czas przeżycia bez progresji choroby (ang. progression-free survival, PFS) oraz poprawa po 12 tygodniach w odniesieniu do objawów związanych z chorobą, oceniona z wykorzystaniem skali oceny objawów raka płuc (LCSS).

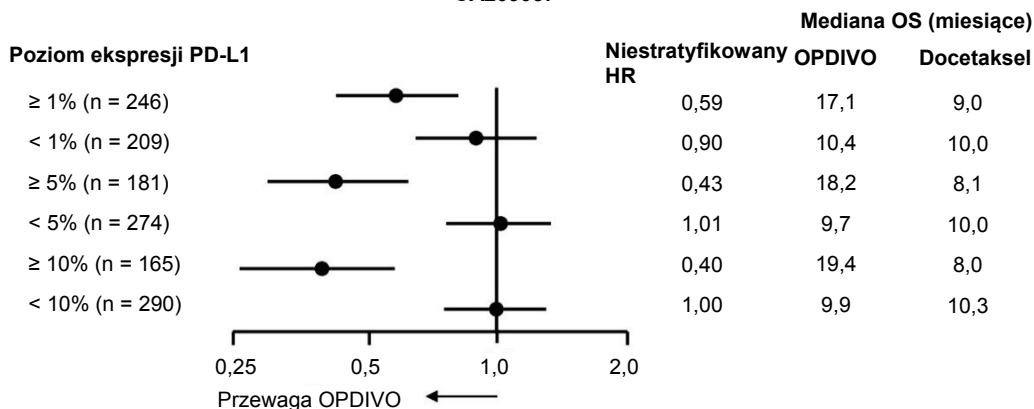
Wyjściowe dane demograficzne i charakterystyka choroby były zasadniczo zrównoważone pomiędzy uczestnikami poddanymi randomizacji w grupach leczonych niwolumabem i docetakselem. Średni wiek wyniósł 62 lata (zakres: 21–85). 34% uczestników było w wieku ≥ 65 lat, a 7% — w wieku ≥ 75 lat. Większość pacjentów stanowiły osoby rasy białej (92%) i mężczyźni (55%); stan sprawności wg ECOG w punkcie początkowym wynosił 0 (31%) lub 1 (69%). Siedemdziesiąt dziewięć procent pacjentów paliło tytoń w przeszłości lub obecnie. Próbkę tkanki nowotworowej pobierano z niepłaskonabłonkowych guzów NSCLC, zgodnie z kryteriami włączenia do udziału w badaniu. W tabeli 10 przedstawiono częstość ekspresji PD-L1 dla każdego zdefiniowanego wstępnie poziomu ekspresji w punkcie początkowym u wszystkich uczestników badania CA209057 poddanych randomizacji.

Tabela 10: Częstość występowania ekspresji PD-L1 przed rozpoczęciem badania u wszystkich chorych na niepłaskonabłonkowego NSCLC poddanych randomizacji — CA209057

Kategoria ekspresji PD-L1 w populacji	Niwolumab 3 mg/kg	Docetaksel	Ogółem
Ogółem	292	290	582
Ekspresja PD-L1 możliwa do oceny ilościowej w punkcie początkowym, N (%)	231 (79,1)	224 (77,2)	455 (78,2)
Poziom ekspresji PD-L1 $\geq 1\%$ w punkcie początkowym	123/231 (53,2)	123/224 (54,9)	246/455 (54,1)
Poziom ekspresji PD-L1 $< 1\%$ w punkcie początkowym	108/231 (46,8)	101/224 (45,1)	209/455 (45,9)
Poziom ekspresji PD-L1 $\geq 5\%$ w punkcie początkowym	95/231 (41,1)	86/224 (38,4)	181/455 (39,8)
Poziom ekspresji PD-L1 $< 5\%$ w punkcie początkowym	136/231 (58,9)	138/224 (61,6)	274/455 (60,2)
Poziom ekspresji PD-L1 $\geq 10\%$ w punkcie początkowym	86/231 (37,2)	79/224 (35,3)	165/455 (36,3)
Poziom ekspresji PD-L1 $< 10\%$ w punkcie początkowym	145/231 (62,8)	145/224 (64,7)	290/455 (63,7)
Ekspresja PD-L1 niemożliwa do oceny ilościowej, N (%)	61 (20,9)	66 (22,8)	127 (21,8)

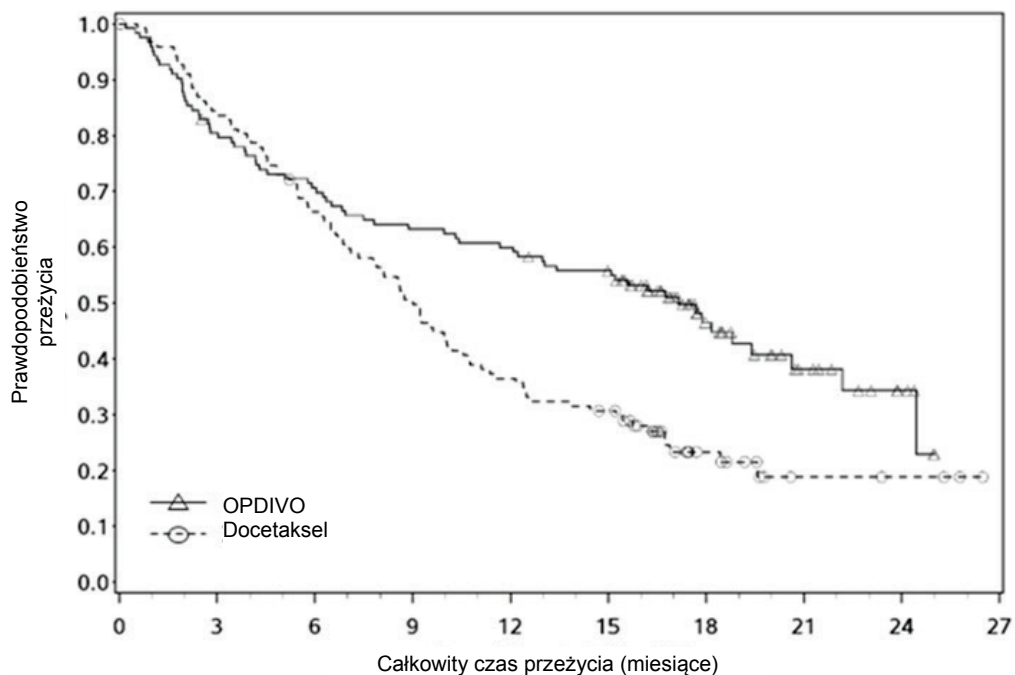
Występowanie ekspresji białka PD-L1 o wszystkich zdefiniowanych wstępnie poziomach w grupie leczonej produktem leczniczym OPDIVO® wiązało się z dłuższym czasem przeżycia w porównaniu z pacjentami leczonymi docetakselem, natomiast brak ekspresji białka PD-L1 był związany z czasem przeżycia zbliżonym do obserwowanego w grupie otrzymującej docetaksel. Po przeprowadzeniu analizy według poziomu ekspresji białka PD-L1 stwierdzono istotne różnice w medianie całkowitego czasu przeżycia (OS) przemawiające na korzyść niwolumabu w porównaniu z docetakselem. Mediana OS wyniosła 17,1, 18,2 i 19,4 miesiąca u uczestników leczonych niwolumabem w porównaniu z 9,0, 8,1 i 8,0 miesiąca w grupie otrzymującej docetaksel, odpowiednio w przypadku ekspresji białka PD-L1 na poziomie $\geq 1\%$, $\geq 5\%$ i $\geq 10\%$. Nie stwierdzono różnic dotyczących OS pomiędzy grupami terapeutycznymi u uczestników z poziomem ekspresji $< 1\%$, $< 5\%$ i $< 10\%$. Zakres mediany OS wyniósł 9,7–10,4 miesiąca w grupie leczonej niwolumabem i 10,1–10,3 miesiąca u uczestników otrzymujących docetaksel. Na rysunku 1 przedstawiono niestratyfikowany współczynnik ryzyka (ang. hazard ratio, HR) oraz medianę całkowitego czasu przeżycia (OS). Na rysunkach 2 i 3 przedstawiono wykres Kaplana-Meiera dla podgrup według poziomu ekspresji białka PD-L1.

Rysunek 1: Wykres typu forest plot — OS na podstawie ekspresji PD-L1 u pacjentów z niepłaskonabłonkowym NSCLC — CA209057



Uwaga: niestratyfikowany współczynnik ryzyka oraz odpowiednie 95% przedziały ufności oszacowano z użyciem modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa z wykorzystaniem grupy poddanej randomizacji jako pojedynczej zmiennej zależnej.

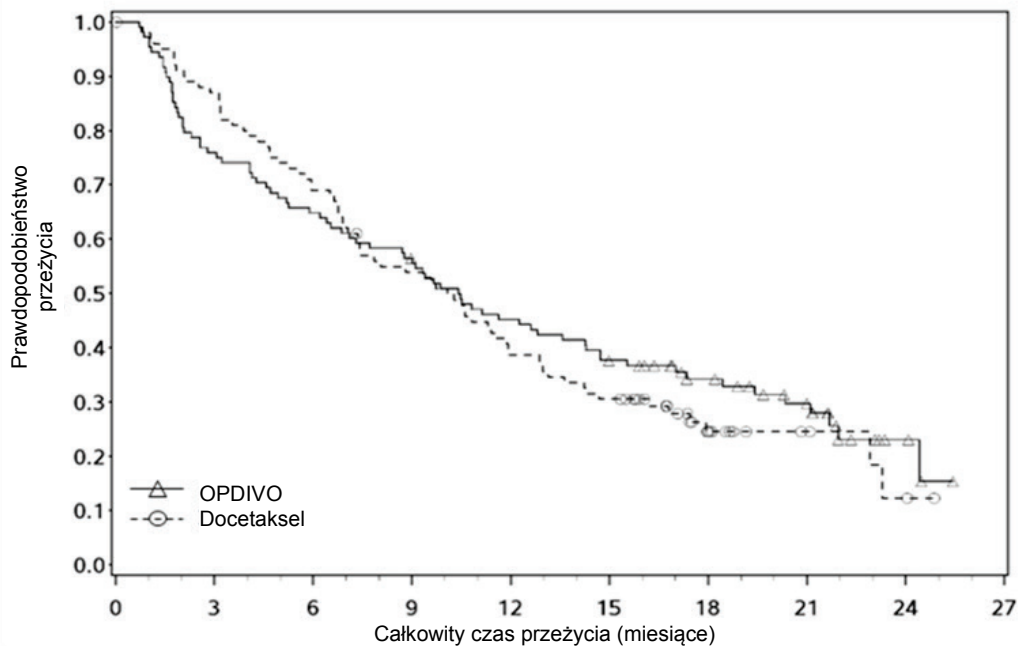
Rysunek 2: Całkowity czas przeżycia — pacjenci z nieplaskonabłonkowym NSCLC z ekspresją PD-L1 \geq 1% — CA209057



Liczba narażonych na ryzyko

	123	98	86	77	73	65	27	13	5	0
Docetaxel	123	102	80	61	44	36	13	4	3	0

Rysunek 3: Całkowity czas przeżycia — pacjenci z nieplaskonabłonkowym NSCLC z ekspresją PD-L1 < 1% — CA209057



Liczba narażonych na ryzyko

	108	82	70	60	48	39	26	17	4	0
Docetaxel	101	87	69	53	38	30	13	5	2	0

17.2 Ocena skuteczności: SCCHN

17.2.1 Czułość analityczna: SCCHN

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 236 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek SCCHN w stadiach I–IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0–95% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0–3.

17.2.2 Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzna: SCCHN

Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono odpowiednio w ośrodku firmy Dako oraz trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Uzyskane dane przedstawiono w tabelach 11 i 12. W celu oceny powtarzalności określono średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ang. average negative percent agreement, ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (ang. average positive percent agreement, APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) w oparciu o porównanie par testów oraz odpowiednich 95% przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona dla każdego poziomu ekspresji PD-L1. W celu oceny odtwarzalności określono procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) w oparciu o niezależne porównanie par testów dla każdego poziomu ekspresji PD-L1. Najczęściej występującą obserwację zastosowano jako punkt odniesienia w celu obliczenia NPA, PPA, OA oraz odpowiednich 95% przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona.

Tabela 11: Powtarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — SCCHN

Powtarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji ≥ 1%	
Pomiędzy partiami	Każdą z 39 próbek SCCHN o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniono z użyciem każdej z trzech partii testowych w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 115 porównań par.	ANA	100 (96,9; 100)
		APA	100 (96,6; 100)
		OA	100 (98,4; 100)

Tabela 12: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — SCCHN, ocena w trzech ośrodkach zewnętrznych

Odtwarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji ≥ 1%	
Analiza pomiędzy ośrodkami (trzy ośrodki)	Zestaw 14 próbek SCCHN o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o niezależne porównanie łącznie 126 par.	NPA	100 (94,3; 100)
		PPA	100 (94,3; 100)
		OA	100 (97,0; 100)
Analiza w obrębie ośrodka	Zestaw 14 próbek SCCHN o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o niezależne porównanie łącznie 126 par.	NPA	100 (94,3; 100)
		PPA	100 (94,3; 100)
		OA	100 (97,0; 100)
Pomiędzy obserwatorami (trzech obserwatorów)	Trzech patologów przeprowadziło po dwie oddzielne oceny zestawu 30 próbek SCCHN, wykazując różne wartości ekspresji PD-L1 IHC przy barwieniu za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, z co najmniej 5-dniowym okresem odstawienia między odczytami. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema patologami w oparciu o niezależne porównanie łącznie 180 par.	NPA	96,7 (90,7; 98,9)
		PPA	97,8 (92,3; 99,4)
		OA	97,2 (93,7; 98,8)
W obrębie obserwatora	Trzech patologów przeprowadziło po dwie oddzielne oceny zestawu 30 próbek SCCHN, wykazując różne wartości ekspresji PD-L1 IHC przy barwieniu za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, z co najmniej 5-dniowym okresem odstawienia między odczytami. Analiza została przeprowadzona dla trzech patologów w oparciu o niezależne porównanie łącznie 180 par.	NPA	100 (95,6; 100)
		PPA	94,8 (88,4; 97,8)
		OA	97,2 (93,7; 98,8)

17.2.3 Ocena skuteczności klinicznej: SCCHN

Przydatność kliniczną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono w randomizowanym badaniu fazy III CA209141, prowadzonym metodą otwartej próby, dotyczącym porównania stosowania niwolumabu i terapii wybranej przez badacza u osób z nawracającym lub przerzutowym, opornym na leczenie związkami platyny rakiem płaskonabłonkowym obszaru głowy i szyi (SCCHN). Pacjentów poddano randomizacji w 55 ośrodkach w 15 krajach (Argentyna, Brazylia, Kanada, Francja, Niemcy, Hongkong, Włochy, Japonia, Korea, Holandia, Hiszpania, Szwajcaria, Tajwan, Wielka Brytania i Stany Zjednoczone Ameryki). Uczestników poddano randomizacji w stosunku 2:1 (niwolumab: terapia wybrana przez badacza), a także stratyfikacji z uwzględnieniem wcześniejszego leczenia cetuksymabem (tak/nie). Przed randomizacją oraz podaniem pierwszej dawki leku (w punkcie początkowym) pobrano próbki tkanki nowotworowej w celu przeprowadzenia zaplanowanych wcześniej analiz dotyczących skuteczności na podstawie określonego wstępnie poziomu ekspresji PD-L1 w punkcie początkowym (cel badawczy). Główną miarą oceny skuteczności był całkowity czas przeżycia (OS). Dodatkowymi miarami oceny skuteczności były: czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) i ogólny wskaźnik odpowiedzi na leczenie (ORR).

W tym badaniu randomizowano łącznie 361 pacjentów: 240 do grupy OPDIVO i 121 pacjentów do grupy terapii wybranej przez badacza (45% otrzymało docetaksel, 43% metoteksat i 12% cetuksymab). Średni wiek wyniósł 60 lat (zakres: 28–83); 31% pacjentów było w wieku ≥ 65 lat, 83% było rasy białej, 12% pochodzenia azjatyckiego i 4% rasy czarnej; 83% pacjentów było mężczyznami. Stan sprawności wg ECOG w punkcie początkowym wynosił 0 (20%) lub 1 (78%); 76% pacjentów paliło tytoń w przeszłości lub obecnie; 90% miało chorobę w stadium IV; 45% przeszło wcześniej tylko jeden cykl systematycznego leczenia, a pozostałe 55% przeszło wcześniej co najmniej dwa cykle systematycznego leczenia; 25% miało nowotwory z ekspresją HPV p16, 24% miało nowotwory bez ekspresji HPV p16, a 51% miało nieznaną status. Próbkę tkanki nowotworowej pobrano z guzów pierwotnych lub przerzutowych SCCHN, zgodnie z kryteriami włączenia do udziału w badaniu. U 327 uczestników (z łącznej liczby 361 uczestników) tkankę nowotworową pobrano w punkcie początkowym z następującym rozkładem według rodzaju guza: 29,7% guz pierwotny, 52,0% guz przerzutowy i 18,3% nie określono. W tabeli 13 przedstawiono częstość ekspresji PD-L1 dla każdego zdefiniowanego wstępnie poziomu ekspresji w punkcie początkowym u wszystkich uczestników badania CA209141 poddanych randomizacji.

Tabela 13: Częstość występowania ekspresji PD-L1 przed rozpoczęciem badania u wszystkich chorych na SCCHN poddanych randomizacji — CA209141

Kategoria ekspresji PD-L1 w populacji	Niwolumab 3 mg/kg (N = 240)	Terapia wybrana przez badacza (N = 121)	Ogółem (N = 361)
Ogółem	240	121	361
Ekspresja PD-L1 możliwa do oceny ilościowej w punkcie początkowym (N (%))	161 (67,1)	99 (81,8)	260 (72,0)
Poziom ekspresji PD-L1 \geq 1% w punkcie początkowym	88/161 (54,7)	61/99 (61,6)	149/260 (57,3)
Poziom ekspresji PD-L1 $<$ 1% w punkcie początkowym	73/161 (45,3)	38/99 (38,4)	111/260 (42,7)
Ekspresja PD-L1 niemożliwa do oceny ilościowej (N (%))	79 (32,9)	22 (18,2)	101 (28,0)

W analizie wstępnej (78% planowanej liczby zdarzeń do analizy końcowej) badanie CA209141 fazy III wykazało statystycznie istotną poprawę OS u uczestników randomizowanych do leczenia niwolumabem w stosunku do terapii wybranej przez badacza. Mediana OS wyniosła 7,5 miesiąca w przypadku uczestników leczonych niwolumabem i 5,1 w przypadku uczestników leczonych terapią wybraną przez badacza ze współczynnikiem ryzyka 0,70 (95% CI: 0,53, 0,92).

We wstępnych analizach podgrup badawczych przeprowadzonych z użyciem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, u pacjentów z ekspresją PD-L1 na poziomie $<$ 1% współczynnik ryzyka przeżycia wyniósł 0,89 (95% CI: 0,54, 1,45), z medianą okresu przeżycia wynoszącą 5,7 i 5,8 odpowiednio dla pacjentów leczonych niwolumabem i pacjentów leczonych chemioterapią. U pacjentów z ekspresją PD-L1 na poziomie \geq 1% współczynnik ryzyka przeżycia wyniósł 0,55 (95% CI: 0,36, 0,83), z medianą okresu przeżycia wynoszącą 8,7 i 4,6 odpowiednio dla pacjentów leczonych niwolumabem i pacjentów poddawanych chemioterapii (16).

17.3 Ocena skuteczności: UC

17.3.1 Czułość analityczna: UC

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 138 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek raka urotelialnego w stadiach III–IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0–90% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0–3.

17.3.2 Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzna: UC

Powtarzalność i odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono odpowiednio w ośrodku firmy Dako oraz trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Uzyskane dane przedstawiono w tabelach 14 i 15. Określono średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ang. average negative percent agreement, ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (ang. average positive percent agreement, APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) w oparciu o porównanie par testów oraz odpowiednich 95% przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona dla każdego poziomu ekspresji PD-L1.

Tabela 14: Powtarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — UC

Powtarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji \geq 1%	Poziom ekspresji \geq 5%
Połączona precyzja	Każdą z 30 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniano w następujących warunkach: 5 operatorów/urządzeń/dni z użyciem jednej partii testowej. Łącznie przeprowadzono 286 niezależnych porównań par.	ANA 96,6 (93,8; 98,1) APA 96,4 (93,5; 98,1) OA 96,5 (94,6; 97,7)	ANA 98,4 (96,5; 99,3) APA 97,0 (93,5; 98,6) OA 97,9 (96,3; 98,8)
Pomiędzy obserwatorami	Każdą z 72 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC była odczytywana 3 razy przez 3 różnych patologów z zachowaniem dwutygodniowego odstępu między odczytami (okres wymywania). Łącznie przeprowadzono 1944 niezależnych porównań par.	ANA 90,3 (88,7; 91,7) APA 93,1 (91,9; 94,1) OA 91,9 (91,0; 92,8)	ANA 87,1 (85,4; 88,6) APA 88,1 (86,5; 89,5) OA 87,6 (86,5; 88,7)
W obrębie obserwatora	Każdą z 72 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC była odczytywana 3 razy przez jednego patologa z zachowaniem dwutygodniowego odstępu między odczytami (okres wymywania). Łącznie przeprowadzono 648 niezależnych porównań par przez 3 patologów.	ANA 95,2 (93,0; 96,7) APA 96,6 (95,0; 97,7) OA 96,0 (94,7; 96,9)	ANA 92,0 (89,5; 93,9) APA 92,6 (90,2; 94,4) OA 92,3 (90,6; 93,7)
Pomiędzy partiami	Każdą z 30 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniano z użyciem 3 różnych partii testowych w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 87 niezależnych porównań par.	ANA 97,8 (92,3; 99,4) APA 97,6 (91,4; 99,3) OA 97,7 (94,2; 99,1)	ANA 98,1 (93,2; 99,5) APA 97,1 (90,0; 99,2) OA 97,7 (94,2; 99,1)
W obrębie serii	Każdą z 30 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniano w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii przez tego samego operatora w urządzeniu Autostainer Link 48. Łącznie przeprowadzono 290 niezależnych porównań par.	ANA 96,3 (93,2; 98,0) APA 96,8 (94,1; 98,3) OA 96,6 (94,7; 97,8)	ANA 96,5 (93,9; 98,0) APA 95,0 (91,4; 97,2) OA 95,9 (93,9; 97,2)

Tabela 15: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — UC, ocena w trzech ośrodkach zewnętrznych

Odtwarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji $\geq 1\%$	Poziom ekspresji $\geq 5\%$
Analiza pomiędzy ośrodkami (trzy ośrodki)	Każdą z 46 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniano w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 3440 par.	ANA 88,0 (87,1, 88,8) APA 85,6 (84,6, 86,5) OA 86,9 (85,7, 88,0)	ANA 94,7 (94,1, 95,2) APA 90,5 (89,7, 91,2) OA 93,2 (92,3, 94,0)
Analiza w obrębie ośrodka	Każdą z 46 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC oceniano w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o porównanie łącznie 1376 par.	ANA 93,5 (92,4, 94,4) APA 92,2 (91,0, 93,2) OA 92,9 (91,4, 94,1)	ANA 95,9 (95,1, 96,6) APA 92,7 (91,6, 93,7) OA 94,8 (93,5, 95,8)
Pomiędzy obserwatorami (jeden obserwator w każdym z trzech ośrodków)	Ocenę 78 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC przeprowadziło trzech patologów, jeden w każdym z trzech ośrodków badawczych, w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 2106 par.	ANA 91,9 (91,0, 92,7) APA 92,5 (91,6, 93,3) OA 92,2 (91,0, 93,3)	ANA 96,0 (95,4, 96,6) APA 94,4 (93,6, 95,1) OA 95,4 (94,4, 96,2)
W obrębie obserwatora	Ocenę 78 próbek raka urotelialnego o różnych poziomach ekspresji PD-L1 IHC przeprowadziło trzech patologów, jeden w każdym z trzech ośrodków badawczych, w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o porównanie łącznie 702 par.	ANA 96,1 (95,0, 97,1) APA 96,4 (95,3, 97,3) OA 96,3 (94,6, 97,5)	ANA 96,8 (95,7, 97,7) APA 95,6 (94,3, 96,6) OA 96,3 (94,6, 97,5)

17.3.3 Ocena skuteczności klinicznej: UC

Użyteczność kliniczną testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono w badaniu klinicznym CA209275 fazy II z jedną grupą badawczą, dotyczącym skuteczności stosowania niwolumabu u uczestników z przerzutowym lub nieoperacyjnym rakiem urotelialnym na etapie progresji lub nawrotu choroby po zastosowaniu leczenia związkami platyny. Do grupy przyjmującej nowolumab zrandomizowano łącznie 270 uczestników w 63 ośrodkach na terenie 11 krajów (Australia, Belgia, Czechy, Finlandia, Niemcy, Włochy, Japonia, Polska, Hiszpania, Szwecja i Stany Zjednoczone). Próbki z tkanką guza pobrane przed rozpoczęciem badania (w punkcie wyjściowym) były systematycznie gromadzone przed randomizacją i przed pierwszym zastosowaniem produktu leczniczego. Główne pierwszorzędowe kryteria oceny skuteczności obejmowały potwierdzony wskaźnik obiektywnej odpowiedzi (ang. objective response rate, ORR), zgodnie z oceną niezależnej komisji oceniającej wyniki badań radiologicznych (IRRC) według kryteriów oceny odpowiedzi nowotworów RECIST w wersji 1.1, oraz czas odpowiedzi (ang. duration of response, DOR).

Średni wiek wyniósł 66 lat (zakres: 39–90), 78% pacjentów było płci męskiej, 86% rasy białej. Dwadzieścia siedem procent miało raka urotelialnego niezwiązanego z pęcherzem moczowym, a 84% przerzuty do narządów mięsnych. U trzydziestu czterech procent pacjentów wystąpiła progresja choroby po zastosowaniu leczenia neoadiuwantowego lub adiuwantowego związkami platyny. Dwadzieścia dziewięć procent pacjentów poddano ≥ 2 wcześniejszemu leczeniu układowemu w stadium przerzutowym choroby. Trzydzieści sześć procent pacjentów poddano wcześniejszemu leczeniu samą cisplatyną, 23% samą karboplatiną, a 7% było leczonych cisplatyną i karboplatiną w stadium przerzutowym choroby. U czterdziestu sześciu procent pacjentów stan sprawności według ECOG wyniósł 1. U osiemnastu procent pacjentów stężenie hemoglobiny wynosiło <10 g/dL, a u dwudziestu ośmiu procent pacjentów w punkcie wyjściowym występowały przerzuty do wątroby. Pacjentów włączano do badania niezależnie od poziomu ekspresji PD-L1.

W badaniu CA209275 spośród 270 pacjentów u 46% poziom ekspresji PD-L1 wynosił $\geq 1\%$ (definiowany jako $\geq 1\%$ komórek guza wykazujących ekspresję białka PD-L1). Pozostałe 54% pacjentów sklasyfikowano jako wykazujących poziom ekspresji PD-L1 $< 1\%$ (definiowany jako $\geq 1\%$ komórek guza wykazujących ekspresję białka PD-L1). Potwierdzony ORR w wszystkich pacjentów i dwie podgrupy PD-L1 podsumowano w tabeli 16. Średni czas odpowiedzi wynosił 1,9 miesiąca (zakres: 1,6–7,2).

Tabela 16: Wyniki skuteczności w badaniu CA209275 (UC)

	Wszyscy uczestnicy poddawani leczeniu N=270	PD-L1 $< 1\%$ N=146	PD-L1 $\geq 1\%$ N=124
Potwierdzony wskaźnik obiektywnej odpowiedzi n (%)	53 (19,6%)	22 (15,1%)	31 (25,0%)
95% CI	15,1–24,9	9,7–21,9	17,7–33,6
Wskaźnik odpowiedzi całkowitej	7 (2,6%)	1 (0,7%)	6 (4,8%)
Wskaźnik odpowiedzi częściowej	46 (17,0%)	21 (14,4%)	25 (20,2%)
Średni czas trwania odpowiedzi*	10,3 (1,9+, 12,0+)	7,6 (3,7+, 12,0+)	NE (1,9+, 12,0+)
Miesiące (zakres)			

*Szacowany na podstawie krzywej Kaplana-Meiera

17.4 Ocena skuteczności: czerniak

17.4.1 Czułość analityczna: czerniak

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została sprawdzona na 104 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek czerniaka w stadiach I–IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0–100% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0–3.

17.4.2 Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzna: czerniak

Powtarzalność / odtwarzalność zewnętrzna testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx oceniono odpowiednio w ośrodku firmy Dako oraz trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Przed przeprowadzeniem oceny wybarwionych skrawków zastosowano zaślepienie i randomizację. Uzyskane dane przedstawiono w tabelach 17 i 18. Określono średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ang. average negative percent agreement, ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (ang. average positive percent agreement, APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) w oparciu o niezbędne porównanie par testów dla każdego poziomu ekspresji PD-L1.

Tabela 17: Powtarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — czerniak

Powtarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji $\geq 1\%$	Poziom ekspresji $\geq 5\%$
Pomiędzy urządzeniami	Każdą z 16 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w każdym z pięciu urządzeń Autostainer Link 48. Przed oceną punktową preparaty poddano zaślepieniu i randomizacji. Łącznie przeprowadzono 160 porównań par.	ANA 89,5 (83,2; 93,6) APA 90,5 (84,8; 94,2) OA 90,0 (86,0; 92,9)	ANA 90,8 (85,7; 94,2) APA 85,5 (77,6; 90,9) OA 88,8 (84,6; 91,9)
Pomiędzy analitykami	Każdą z 16 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniło sześciu analityków w jednym urządzeniu Autostainer Link 48. Przed oceną punktową preparaty poddano zaślepieniu i randomizacji. Łącznie przeprowadzono 235 porównań par.	ANA 96,4 (92,9; 98,2) APA 96,8 (93,8; 98,4) OA 96,6 (94,5; 97,9)	ANA 91,3 (87,1; 94,2) APA 88,8 (83,4; 92,6) OA 90,2 (87,0; 92,7)
Pomiędzy dniami	Każdą z 16 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Autostainer Link 48. Przed oceną punktową preparaty poddano zaślepieniu i randomizacji. Łącznie przeprowadzono 160 porównań par.	ANA 95,5 (90,3; 97,9) APA 96,8 (93,1; 98,6) OA 96,3 (93,5; 97,9)	ANA 90,0 (84,0; 93,9) APA 90,0 (84,0; 93,9) OA 90,0 (86,0; 92,9)
Pomiędzy partiami	Każdą z 16 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono z użyciem każdej z trzech partii odczynników w urządzeniu Autostainer Link 48. Przed oceną punktową preparaty poddano zaślepieniu i randomizacji. Łącznie przeprowadzono 702 porównań par.	ANA 98,6 (97,3; 99,3) APA 98,8 (97,8; 99,4) OA 98,7 (98,0; 99,2)	ANA 92,6 (90,6; 94,2) APA 86,6 (83,1; 89,5) OA 90,5 (88,7; 91,9)
W obrębie serii	Każdą z 16 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w pięciu powtórzeniach w obrębie serii w urządzeniu Autostainer Link 48. Przed oceną punktową preparaty poddano zaślepieniu i randomizacji. Łącznie przeprowadzono 153 porównań par.	ANA 97,1 (92,6; 98,9) APA 97,7 (94,1; 99,1) OA 97,4 (94,9; 98,7)	ANA 93,6 (89,0; 96,4) APA 89,8 (82,7; 94,2) OA 92,2 (88,4; 94,8)

Tabela 18: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx — czerniak, ocena w trzech ośrodkach zewnętrznych

Odtwarzalność	Metoda	% zgodności (95% CI)	
		Poziom ekspresji $\geq 1\%$	Poziom ekspresji $\geq 5\%$
Analiza pomiędzy ośrodkami (trzy ośrodki)	Każdą z 18 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 1350 par.	ANA 99,3 (98,8; 99,7) APA 99,3 (98,8; 99,7) OA 99,3 (98,7; 99,7)	ANA 93,8 (92,5; 95,1) APA 92,7 (91,2; 94,2) OA 93,3 (91,9; 94,7)
Analiza w obrębie ośrodka	Każdą z 18 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC oceniono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o porównanie łącznie 540 par.	ANA 99,3 (98,4; 99,8) APA 99,3 (98,5; 99,8) OA 99,3 (98,5; 99,8)	ANA 97,3 (95,8; 98,5) APA 96,8 (95,1; 98,2) OA 97,0 (95,6; 98,3)
Pomiędzy obserwatorami (jeden obserwator w każdym z trzech ośrodków)	Ocena 30 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 810 par.	ANA 90,4 (88,1; 92,5) APA 91,7 (89,7; 93,6) OA 91,1 (89,1; 93,1)	ANA 93,2 (91,3; 94,8) APA 91,9 (89,8; 93,9) OA 92,6 (90,7; 94,3)
W ramach obserwatora (jeden obserwator w każdym z trzech ośrodków)	Ocena 30 próbek czerniaka o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, barwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o porównanie łącznie 270 par.	ANA 99,2 (97,9; 100) APA 99,3 (98,2; 100) OA 99,3 (98,1; 100)	ANA 97,9 (96,1; 99,4) APA 97,6 (95,4; 99,2) OA 97,8 (95,9; 99,3)

17.4.3 Ocena skuteczności klinicznej: czerniak

Test PD-L1 IHC 28-8 pharmDx został oceniony z wykorzystaniem próbek pochodzących od pacjentów włączonych do udziału w badaniu klinicznym CA209067, randomizowanym badaniu klinicznym fazy III, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, oceniającym stosowanie niwolumabu w monoterapii lub skojarzenia niwolumabu i ipilimumabu w porównaniu z ipilimumabem w monoterapii u nieleczonej wcześniej pacjentów z przerzutowym czerniakiem. Do udziału w badaniu włączono 1296 pacjentów ze 137 ośrodków w 21 krajach (Australia, Austria, Belgia, Kanada, Czechy, Dania, Finlandia, Francja, Niemcy, Irlandia, Izrael, Włochy, Holandia, Nowa Zelandia, Norwegia, Polska, Hiszpania, Szwecja, Szwajcaria, Wielka Brytania i Stany Zjednoczone). Spośród 1296 pacjentów włączonych do udziału w badaniu 945 przydzielono losowo w stosunku 1:1:1 do jednej z grup terapeutycznych, a także poddano stratyfikacji według statusu ekspresji PD-L1 ($\geq 5\%$ na podstawie wyników testu przeprowadzonego w ramach badania klinicznego), statusu mutacji w genie BRAF oraz stadium AJCC M. Wyjściowe dane demograficzne i charakterystyka choroby były zasadniczo zrównoważone pomiędzy pacjentami poddanymi randomizacji w grupach terapeutycznych. Średni wiek wyniósł 60 lat (zakres: 18–90). 40% uczestników było w wieku ≥ 65 lat, a 13% — w wieku ≥ 75 lat. Większość pacjentów stanowiły osoby rasy białej (97%) i mężczyźni (65%).

Próbki od pacjentów z czerniakiem pobrano przed rozpoczęciem badania (w punkcie początkowym), z czego w 86% przypadków z miejsc występowania przerzutów. Spośród 945 pacjentów poddanych randomizacji w ramach badania retrospektywne badanie

archiwalnej tkanki nowotworu z użyciem testu PD-L1 IHC 28-8 pharmDx wykonano u 915 (97%) osób. W przypadku 55 (6%) pacjentów obecność melaniny uniemożliwiła ocenę statusu ekspresji PD-L1, a w przypadku 47 (5%) pacjentów status ekspresji PD-L1 był nieznaną z powodu wycofania zgody na uczestnictwo lub braku próbek. W związku z tym status ekspresji PD-L1 ustalono w przypadku 843 (89%) pacjentów biorących udział w badaniu. Odsetek pacjentów z ekspresją PD-L1 w tkankach nowotworowych na poziomie $\geq 1\%$ i $< 1\%$ był zrównoważony pomiędzy grupami terapeutycznymi. W tabeli 19 przedstawiono status ekspresji PD-L1 u pacjentów z wynikami testu PD-L1 IHC pharmDx w badaniu CA209067.

Tabela 19: Częstość występowania ekspresji PD-L1 u wszystkich chorych na czerniaka poddanych randomizacji — CA209067

	Liczba uczestników, n (%)		
	niwolumab	niwolumab + ipilimumab	ipilimumab
Uczestnicy z możliwością oceny ilościowej ekspresji PD-L1 ^a	288	278	277
Poziom ekspresji PD-L1:			
≥1%	171 (59,4)	155 (55,8)	164 (59,2)
< 1%	117 (40,6)	123 (44,2)	113 (40,8)
≥5%	80 (27,8)	68 (24,5)	75 (27,1)
< 5%	208 (72,2)	210 (75,5)	202 (72,9)

^a Przedstawiono tylko liczbę wyników z możliwą do oceny ilościowej ekspresją PD-L1; nie uwzględniono przypadków, w których określenie ekspresji PD-L1 nie było możliwe.

W przypadku stosowania niwolumabu i skojarzenia niwolumabu z ipilimumabem wykazano wydłużenie PFS w porównaniu z ipilimumabem we wszystkich podgrupach według poziomu ekspresji PD-L1. Porównanie działania niwolumabu w skojarzeniu z ipilimumabem z działaniem samego niwolumabu nie było głównym celem badania, dlatego podczas badania nie wykonywano czynności w celu wykrycia tej różnicy. Jednak u uczestników z niskimi poziomami ekspresji PD-L1 w przypadku stosowania niwolumabu w skojarzeniu z ipilimumabem wykazano wydłużenie PFS w porównaniu z monoterapią niwolumabem. U uczestników z wysokimi poziomami ekspresji PD-L1 PFS był porównywalny w grupach leczonych niwolumabem i niwolumabem w skojarzeniu z ipilimumabem.

W grupach terapeutycznych leczonych niwolumabem i niwolumabem w skojarzeniu z ipilimumabem stwierdzono wyższy ORR dla obu definicji statusu ekspresji PD-L1 (ekspresja w błonie komórkowej komórek nowotworowych na poziomie $\geq 1\%$ lub $\geq 5\%$) w porównaniu z grupą otrzymującą ipilimumab. W przypadku uczestników leczonych niwolumabem i niwolumabem w skojarzeniu z ipilimumabem, u których ekspresja w błonie komórkowej komórek nowotworowych była na poziomie $\geq 1\%$ lub $\geq 5\%$, zaobserwowano numerycznie wyższy ORR w porównaniu z pacjentami z ekspresją odpowiednio na poziomie $< 1\%$ lub $< 5\%$. W grupie leczonej ipilimumabem ORR były porównywalne we wszystkich podgrupach wg statusu ekspresji PD-L1 niezależnie od definicji ekspresji PD-L1 (ekspresja w błonie komórkowej komórek nowotworowych na poziomie $\geq 1\%$ lub $\geq 5\%$). Dodatkowo podczas stosowania niwolumabu w skojarzeniu z ipilimumabem zaobserwowano wyższy ORR w porównaniu z niwolumabem podawanym w monoterapii niezależnie od poziomu ekspresji PD-L1.

Na podstawie analiz ekspresji PD-L1 z tego badania stwierdzono, że większe korzyści w odniesieniu do PFS podczas stosowania niwolumabu w skojarzeniu z ipilimumabem w porównaniu z niwolumabem w monoterapii mogą wystąpić w przypadku ekspresji PD-L1 na poziomie $< 5\%$. Ekspresję PD-L1 można wykorzystać w celu ułatwienia oceny, u których pacjentów należy rozważyć stosowanie niwolumabu w skojarzeniu z ipilimumabem lub niwolumabu w monoterapii, jednak te informacje należy wykorzystywać w kontekście wszystkich dostępnych informacji klinicznych, gdyż odpowiedzi na leczenie o znaczeniu klinicznym obserwowano we wszystkich podgrupach według statusu ekspresji PD-L1. W przypadku wszystkich poziomów ekspresji PD-L1 w populacji z zaplanowanym leczeniem otrzymującej niwolumab w skojarzeniu z ipilimumabem stwierdzono poprawę skuteczności w porównaniu z ipilimumabem w monoterapii.

W tabeli 20 przedstawiono współczynniki ryzyka (HR) dla PFS oraz medianę PFS według poziomu ekspresji PD-L1. W tabeli 21 przedstawiono oceniony przez badacza ORR według poziomu ekspresji PD-L1.

Tabela 20: Podsumowanie czasu przeżycia bez progresji choroby według poziomu ekspresji PD-L1 oraz grupy terapeutycznej — wszyscy uczestnicy z czerniakiem poddani randomizacji — CA209067

Grupa terapeutyczna	Poziom ekspresji PD-L1	N zdarzeń/ N pacjentów	Mediana PFS w miesiącach (95% CI)	HR w porównaniu z ipilimumab (95% CI)	HR w porównaniu z monoterapią niwolumabem (95% CI)
niwolumab + ipilimumab	≥ 5%	28/68	13,96 (9,72; NR)	0,39 (0,25; 0,62)	0,96 (0,58; 1,58)
	< 5%	103/210	11,24 (7,98; NR)	0,42 (0,32; 0,54)	0,70 (0,54; 0,91)
	≥ 1%	72/155	12,35 (8,51; NR)	0,44 (0,32; 0,58)	0,95 (0,69; 1,31)
	< 1%	59/123	11,17 (6,93; NR)	0,38 (0,27; 0,53)	0,56 (0,40; 0,79)
niwolumab	≥ 5%	33/80	14,00 (9,07; NR)	0,41 (0,26; 0,63)	--
	< 5%	122/208	5,32 (2,83; 7,06)	0,59 (0,47; 0,75)	--
	≥ 1%	79/171	12,39 (8,11; NR)	0,46 (0,34; 0,61)	--
	< 1%	76/117	2,83 (2,76; 5,13)	0,67 (0,49; 0,92)	--
ipilimumab	≥ 5%	53/75	3,94 (2,79; 4,21)	--	--
	< 5%	154/202	2,83 (2,76; 3,09)	--	--
	≥ 1%	122/164	3,91 (2,83; 4,17)	--	--
	< 1%	85/113	2,79 (2,66; 2,96)	--	--

Skróty: CI = przedział ufności (ang. confidence interval), NR = nie osiągnięto (ang. not reached), PFS = czas przeżycia bez progresji choroby (ang. progression-free survival)

HR = współczynnik ryzyka (ang. hazard ratio) dla efektu leczenia na podstawie modelu proporcjonalnego ryzyka Coxa z uwzględnieniem rodzaju leczenia, statusu ekspresji PD-L1 oraz interakcji pomiędzy rodzajem leczenia i statusem ekspresji PD-L1.

Tabela 21: Oceniony przez badacza ORR: chorzy na czerniaka według ekspresji PD-L1 — uczestnicy z ocenioną ekspresją PD-L1 — CA209067

Grupa terapeutyczna	Poziom ekspresji PD-L1	Liczba pacjentów	ORR	
			%	[95% CI]
Nivolumab + ipilimumab	≥ 5%	68	72%	(59,9; 82,3)
	< 5%	210	55%	(47,8; 61,6)
	≥ 1%	155	65%	(56,4; 72,0)
	< 1%	123	52%	(42,8; 61,1)
Nivolumab	≥ 5%	80	58%	(45,9; 68,5)
	< 5%	208	41%	(34,6; 48,4)
	≥ 1%	171	54%	(46,6; 62,0)
	< 1%	117	33%	(24,9; 42,6)
Ipilimumab	≥ 5%	75	21%	(12,7; 32,3)
	< 5%	202	18%	(12,8; 23,8)
	≥ 1%	164	19%	(13,2; 25,7)
	< 1%	113	19%	(11,9; 27,0)

18. Rozwiązywanie problemów

Rozdział 22: Rozwiązywanie problemów

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak odczynu w preparatach kontrolnych lub próbkach.	1a. Błąd związany z programowaniem.	1a. Sprawdzić, czy do programowania preparatów wybrano program SK005 PD-L1 IHC 28-8 pharmDx.
	1b. Brak reakcji z roztworem DAB+ Substrate-Chromogen Solution (DAB).	1b. Sprawdzić, czy roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution został przygotowany prawidłowo.
	1c. Obecność azydru sodu w buforze płuczającym.	1c. Używać wyłącznie buforu Dako Wash Buffer (nr kat. K8007).
	1d. Degradacja preparatu kontrolnego.	1d. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu zamieszczone na zewnętrznej powierzchni opakowania.
2. Stabe wybarwienie preparatów.	2a. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	2a. Upewnić się, że stosowany jest wyłącznie roztwór obojętnej buforowanej formaliny jako środek utrwalający oraz zatwierdzone metody utrwalania.
	2b. Niedostateczna objętość zastosowanego odczynnika.	2b. Sprawdzić wielkość skrawka tkankowego i objętość zastosowanego odczynnika.
	2c. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	2c. Używać wyłącznie buforu Dako Wash Buffer (nr kat. K8007).
3. Stabe wybarwienie preparatów lub linii komórek dodatnich w obrębie preparatu kontrolnego dostarczonego przez firmę Dako.	3a. Niewystarczające odmaskowanie antygeny.	3a. Sprawdzić, czy przeprowadzono prawidłowo procedurę obróbki wstępnej „3-w-1”.
	3b. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	3b. Używać wyłącznie buforu Dako Wash Buffer (nr kat. K8007).
4. Nadmierne wybarwienie tła preparatów.	4a. Niecałkowicie usunięta parafina.	4a. Sprawdzić, czy przeprowadzono prawidłowo procedurę obróbki wstępnej „3-w-1”.
	4b. Wyschnięte preparaty podczas ładowania do urządzenia Autostainer Link 48.	4b. Sprawdzić, czy preparaty są zwilżone buforem podczas ładowania i przed rozpoczęciem serii.
	4c. Nieswoiste wiązanie odczynników ze skrawkami tkankowymi.	4c. Sprawdzić próbki pod kątem właściwego utrwalenia i/lub obecności martwicy.
	4d. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	4d. Upewnić się, że stosowany jest wyłącznie roztwór obojętnej buforowanej formaliny jako środek utrwalający oraz zatwierdzone metody utrwalania.
5. Tkanki oddzielone od szkiełek.	5a. Zastosowanie nieprawidłowych szkiełek mikroskopowych.	5a. Stosować szkiełka Dako FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub Fisherbrand Superfrost Plus.
	5b. Nieodpowiednie przygotowanie próbek.	5b. Pocięte skrawki należy przed barwieniem umieścić na 1 godzinę w ciepłarnie w temperaturze 58°C ± 2°C.
6. Za silny odczyn swoisty.	6a. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	6a. Upewnić się, że stosowane są wyłącznie zatwierdzone środki utrwalające i metody utrwalania.
	6b. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	6b. Używać wyłącznie buforu Dako Wash Buffer (nr kat. K8007).
7. Roztwór Target Retrieval Solution po podgrzaniu ulega zmętnieniu.	7. Po podgrzaniu roztwór Target Retrieval Solution ulega zmętnieniu.	7. Jest to normalne zjawisko, które nie ma wpływu na proces barwienia.










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 Dako w celu uzyskania dalszej pomocy. Dodatkowe informacje na temat technik barwienia oraz przygotowywania próbek zawiera poradnik szkoleniowy firmy Dako: *Immunohistochemical Staining Methods (Metody barwienia immunohistochemicznego)* (15) (udostępniany przez firmę Dako).

19. Piśmiennictwo

1. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(2):207-212.
2. Wang C, Thudium KB, Han M, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(9):846-56.

3. OPDIVO® package insert.
4. YERVOY® package insert.
5. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 10.1056/NEJMoa1507643.
6. Phillips T, Simmons P, Inzunza HD, et al. Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer. *Appl Immuno Molec Morph* 2015; 23(8):541-9.
7. Phelps RM, et al. NCI-navy medical oncology branch cell line data base. *J. Cell. Biochem.* 1996; 63: 32-91.
8. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 375–84.
9. Postow M, Chesney J, Pavlick A, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 372(21):2006-17.
10. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 373(1):23-34.
11. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New Eng. J. Med.* 2012; 366(26):2455-2465.
12. 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.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document M29-A4 [ISBN 1-56238-962-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2014.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCCLS). Quality assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved guideline. CLSI document I/LA28-A2; Vol. 31 No. 4 (ISBN 1-56238-745-6) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; 2011.
15. Taylor CR and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2013.
16. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck, *N Engl J Med.* 2016; DOI: 10.1056/NEJMoa1602252.
17. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.

Objaśnienia symboli

 Numer katalogowy	 Ograniczenie temperatury	 Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
 Producent	 Numer partii	 Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <n> testów
 Zużyć przed	 Sprawdzić w instrukcji obsługi	 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/Wer. D

Wydanie 04/19