

**HercepTest™  
for Automated Link Platforms**

Nr kat. SK001

Wydanie 27.

## Spis treści

	Strona
Przeznaczenie.....	3
Streszczenie i informacje ogólne - sutek.....	4
Zasady procedury - sutek.....	4
Dostarczane materiały - sutek.....	4
HercepTest™ Control Slides.....	5
Materiały wymagane, ale niedostarczane - sutek.....	5
Środki ostrożności - sutek.....	5
Przechowywanie - sutek.....	6
Przygotowanie próbek - sutek.....	7
Przygotowanie odczynników - sutek.....	7
Wykonanie odczynu - sutek.....	8
Kontrola jakości - sutek.....	9
Interpretacja odczynu - sutek.....	10
Ograniczenia ogólne - sutek.....	12
Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu - sutek.....	12
Charakterystyka wydajnościowa - sutek.....	13
Rozwiązywanie problemów - sutek.....	15
Streszczenie i informacje ogólne - żołądek.....	18
Zasada testu - żołądek.....	18
Dostarczane materiały - żołądek.....	18
HercepTest™ Control Slides.....	19
Materiały wymagane, ale niedostarczane - żołądek.....	19
Środki ostrożności - żołądek.....	19
Przechowywanie - żołądek.....	20
Przygotowanie próbek - żołądek.....	21
Przygotowanie odczynników - żołądek.....	21
Wykonanie odczynu - żołądek.....	22
Kontrola jakości - żołądek.....	23
Interpretacja odczynu - żołądek.....	24
Ograniczenia ogólne - żołądek.....	26
Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu - żołądek.....	27
Charakterystyka wydajnościowa - żołądek.....	27
Rozwiązywanie problemów - żołądek.....	31
Piśmiennictwo.....	33
Objaśnienie symboli.....	35

## Przeznaczenie

### **Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.**

HercepTest™ to półilościowy test immunocytochemiczny służący do wykrywania nadmiernej ekspresji białka HER2 w tkankach raka sutka poddawanych rutynowym badaniom histologicznym i w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie skrawkach tkanek raka od pacjentów z gruczolakorakiem połączonym zespoleniem żołądkowo-przełykowym. HercepTest™ jest przeznaczony do wspomagania badania pacjentów, u których rozważane jest podjęcie leczenia lekiem Herceptin™ (trastuzumab) (zob. ulotka dołączona do opakowania Herceptin™).

**UWAGA dotycząca wyłącznie raka sutka:** Wszystkich pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych leku Herceptin™ wybierano przy użyciu testu immunocytochemicznego przeznaczonego do badań klinicznych (CTA, ang. clinical trial assay). Żadnego z pacjentów uczestniczącego w tych badaniach nie wybierano przy użyciu testu HercepTest™. Test HercepTest™ porównano z testem przeznaczonym do badań klinicznych na niezależnie wybranym zbiorze próbek, stwierdzając możliwą do przyjęcia zgodność wyników. Nie ustalono jednak faktycznej korelacji między wynikami testu HercepTest™ a klinicznymi wynikami stosowania leku Herceptin™.

**UWAGA dotycząca wyłącznie nowotworów żołądka:** Wszyscy pacjenci fazy III badania BO18255 (ToGA) sponsorowanego przez Hoffmann-La Roche zostali dobrani z zastosowaniem testu Dako HercepTest™ (IHC) i zestawu Dako HER2 FISH pharmDx™ Kit (FISH). Badanie wykazało użyteczność kliniczną obu testów przy ocenie statusu HER2 pacjentów z nieoperacyjnym, miejscowo zaawansowanym gruczolakorakiem żołądka, nawracającym i/lub przerzutowym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego.

Ilości odczynników w niniejszym zestawie, nr kat. SK001, dobrano specjalnie pod kątem użycia ze automatyzowanym systemem Dako Link.

*HercepTest™ i Herceptin™ są znakami towarowymi firmy Genentech, Inc. i są wykorzystywane na licencji udzielonej firmom Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd. oraz F. Hoffmann-La Roche Ltd.*

Gruczolakorak żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, jest w tym dokumencie nazywany rakiem żołądka.

Szczegółowe informacje o aplikacji raka sutka na stronach 4-17

Szczegółowe informacje o aplikacji raka żołądka na stronach 18-32

**Ważne: Należy zwrócić uwagę na różnice pomiędzy tkanką nowotworu sutka i żołądka, zwłaszcza przy Interpretacji wyniku barwienia.**

## Streszczenie i informacje ogólne - sutek

### Dodatkowe informacje

Ludzki gen *HER2* (znany także jako *ERBB2* lub *NEU*) koduje białko oznaczane najczęściej symbolem HER2 lub p185<sup>HER2</sup>. Białko HER2 to transbłonowe białko receptorowe o aktywności kinazy tyrozynowej, wykazujące homologię do receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1) (1-8). Białko HER2 jest składnikiem prawidłowym, wykazującym ekspresję w różnych typach komórek nabłonkowych (8).

U pewnego ułamka chorych na raka sutka białko HER2 wykazuje nadmierną ekspresję w procesie zezłóśliwiania i progresji nowotworu (9). Nadmierna ekspresja białka HER2 na powierzchni komórek raka sutka stała się punktem wyjścia do opracowania metody leczenia przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku. Herceptin<sup>TM</sup> (trastuzumab) to „uczłowieczone” przeciwciało monoklonalne (10), które wiąże się z białkiem HER2, wykazując do niego silne powinowactwo. W badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że przeciwciało to blokuje rozrost ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadmierną ekspresję białka HER2 (11-13).

### Właściwości

Test HercepTest<sup>TM</sup> opracowano jako alternatywę dla testu badawczego CTA używanego w badaniach klinicznych leku Herceptin<sup>TM</sup>. Charakterystykę wydajnościową testu HercepTest<sup>TM</sup> w określaniu nadmiernej ekspresji białka HER2 oceniano w niezależnym badaniu porównującym wyniki testu HercepTest<sup>TM</sup> z wynikami testu do badań klinicznych na 548 próbkach tkanki raka sutka, przy czym żadna z tych próbek nie pochodziła od pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych leku Herceptin<sup>TM</sup>. Wyniki wykazały 79-procentową zgodność między wynikami obu testów wykonanych na tych próbkach tkankowych.

Z danych dotyczących zgodności wynika również wysokie prawdopodobieństwo zaistnienia odpowiedniości między odczytem 3+ w teście HercepTest<sup>TM</sup> a dodatnim odczytem 2+ lub 3+ w teście badawczym — taki odczyt spełniałby kryteria włączenia do badania. Wyniki 2+ w teście HercepTest<sup>TM</sup> nie były równie dobrze skorelowane z wynikami testu badawczego. Około 42% (53/126) wyników w teście HercepTest<sup>TM</sup> 2+ odpowiadało ujemnym wynikom testu badawczego (0 - 1+), które nie spełniają kryteriów włączenia do badań klinicznych leku Herceptin<sup>TM</sup>.

Wynik testu HercepTest<sup>TM</sup> w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2 interpretuje się jako ujemny (odczyn o intensywności 0 i 1+), słabo dodatni (intensywność odczynu 2+) albo silnie dodatni (intensywność odczynu 3+). Pacjenci ani lekarze nie powinni wykorzystywać wyników testu HercepTest<sup>TM</sup> jako podstawy do prognoz; test HercepTest<sup>TM</sup> nie został zatwierdzony do takich zastosowań.

## Zasady procedury - sutek

Test HercepTest<sup>TM</sup> zawiera odczynniki potrzebne do wykonania dwuetapowej procedury barwienia immunocytochemicznego na standardowo przetworzonych próbkach zatopionych w parafinie. W omawianym zestawie po zakończeniu inkubacji pierwotnych przeciwciał króliczych z ludzkim białkiem HER2 następuje reakcja z gotowym barwnym odczynnikiem Visualization Reagent produkowanym w oparciu o technologię stosowaną do wytwarzania dekstranu. W skład odczynnika wchodzi cząsteczki wtórnych przeciwciał kozich skierowanych przeciw immunoglobulinom króliczym oraz cząsteczki peroksydazy chrzanowej połączone ze wspólnym szkieletem polimerowym dekstranu. W ten sposób wyeliminowano konieczność sekwencyjnego stosowania przeciwciała wtórnego i koniugatu peroksydazy. Reakcję krzyżową odczynnika Visualization Reagent z immunoglobulinami ludzkimi i płodową surowicą cielęcą wyeliminowano poprzez absorpcję w fazie stałej. Po dodaniu chromogenu następuje reakcja enzymatyczna, której efektem jest widoczny produkt, zlokalizowany w miejscu występowania antygenu. Następnie można wykonać barwienie kontrastowe i nakryć preparat szkiełkiem nakrywkowym. Wynik reakcji ocenia się w mikroskopii świetlnej. Zestaw zawiera szkiełka kontrolne zawierające trzy utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie ludzkie linie komórkowe raka sutka, dające odczyny o nasileniu odpowiednio 0, 1+ i 3+. Służą one do weryfikacji serii odczynów. Nasilenie odczynu tych linii komórkowych jest skorelowane z liczbą receptorów przypadających na komórkę.

HercepTest<sup>TM</sup> for Automated Link Platforms, nr kat. SK001, jest przeznaczony do zautomatyzowanego wykonywania odczynu za pomocą zautomatyzowanego systemu Dako Automated Link.

## Dostarczane materiały - sutek

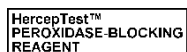
### Nr kat. SK001

Wyszczególnione poniżej materiały wystarczają na wykonanie 50 testów (50 szkiełek mikroskopowych inkubowanych z odczynnikiem przeciwciałem pierwotnym przeciwko białku HER2 oraz 50 szkiełek inkubowanych z odpowiednim odczynnikiem do kontroli ujemnej). Obliczając liczbę testów przyjęto, że zużycie wynosi 200 µL odczynnika na sekcje tkanki (22 mm x 22 mm) (z wyjątkiem Epitope Retrieval Solution). Materiał znajdujący się w zestawie wystarcza na wykonanie co najwyżej 10 pojedynczych serii oznaczeń.

#### Ilość

#### Opis

1 x 22 mL



#### HercepTest<sup>TM</sup> Peroxidase-Blocking Reagent

3% roztwór nadtlenu wodoru z dodatkiem azydki sodu (NaN<sub>3</sub>) w stężeniu 15 mmol/L.

1 x 12 mL



#### HercepTest<sup>TM</sup> Rabbit Anti-Human HER2 Protein

Gotowe do użycia przeciwciała wyizolowane ze względu na powinowactwo. Dostarczany w buforze Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN<sub>3</sub> 15 mmol/L, pH 7,2, z dodatkiem białka stabilizującego.

Immunogen: syntetyczny fragment C-końcowy (część wewnątrzcytoplazmatyczna) białka HER2 sprzężony z KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

Swoistość: białko HER2.

Metoda oczyszczania: przeciwciała są izolowane ze względu na powinowactwo przy użyciu immobilizowanego peptydu białka HER2.

1 x 22 mL



#### HercepTest<sup>TM</sup> Visualization Reagent

Polimer dekstranowy skoniugowany z peroksydazą chrzanową oraz przeciwciała kozie izolowane ze względu na powinowactwo, skierowane przeciw antygenom króliczym. Dostarczany w buforze Tris/HCl zawierającym białko stabilizujące i środek przeciwbakteryjny.

1 x 10 mL	<b>HercepTest™ NEGATIVE CONTROL REAGENT</b>
	<b>HercepTest™ Negative Control Reagent</b> Frakcja immunoglobulinowa prawidłowej surowicy króliczej rozcieńczona do takiego samego stężenia białek, jak przeciwciała przeciwko białku HER2. Dostarczany w buforze Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN <sub>3</sub> 15 mmol/L, pH 7,2, z dodatkiem białka stabilizującego.
2 x 22 mL	<b>HercepTest™ DAB SUBSTRATE BUFFER</b>
	<b>HercepTest™ DAB Substrate Buffer</b> Roztwór buforowy substratu, pH 7,5, zawierający roztwór nadtlenu wodoru o stężeniu < 0,1 %, substancje stabilizujące, substancje wzbogacające i środek przeciwbakteryjny.
1 x 1 mL	<b>HercepTest™ DAB CHROMOGEN</b>
	<b>HercepTest™ DAB Chromogen</b> Roztwór tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzydyny o stężeniu 5% w roztworze chromogenu
3 x 500 mL	<b>HercepTest™ EPI TOPE RETRIEVAL SOLUTION (CONTAINING DETERGENT) (10x)</b>
	<b>HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (Containing Detergent) (10x)</b> Roztwór cytrynianowy o stężeniu 0,1 mol/L z dodatkiem środka przeciwbakteryjnego.
2 x 5 szkiełek	<b>HercepTest™ CONTROL SLIDES</b>
	<b>HercepTest™ Control Slides</b> Każdy preparat zawiera skrawki trzech utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie linii komórkowych raka sutka wykazujących różne poziomy ekspresji białka HER2: MDA-231 (0), MDA-175 (1+) oraz SK-BR-3 (3+). Preparaty do kontroli jakości zostały poddane obróbce cieplnej w celu uzyskania lepszego przylegania skrawków do szkiełek. Jakakolwiek dodatkowa obróbka cieplna preparatów do kontroli jakości przeprowadzona w celu poprawy przylegania skrawków do szkiełek może negatywnie wpłynąć na wyniki odczynu.
10 x butelek	<b>USER-FILLABLE REAGENT BOTTLE 12 mL CAPACITY</b>
	<b>Butelka na odczynniki napełniana przez użytkownika, pojemność 12 ml</b> Każda butelka może zawierać 12 mL odczynnika. Butelki te są przeznaczone do mieszania i przechowywania roztworu Substrate-Chromogen Solution (patrz także część Przygotowanie odczynników).

**UWAGA:** Wszystkie odczynniki zostały przygotowane specjalnie do użycia z tym testem. Warunkiem przeprowadzenia testu zgodnie z zaleceniami jest niestosowanie zamienników.

#### Materiały wymagane, ale niedostarczane - sutek

#### Bufor płuczący Dako Wash Buffer (nr kat. S3006)

Barwnik kontrastowy: hematoksylina, na przykład Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308)  
Szkiełka nakrywkowe  
Woda destylowana lub dejonizowana  
Suszarka umożliwiająca utrzymanie temperatury 60°C lub niższej  
Etanol absolutny i roztwór o stężeniu 95%  
Mikroskop świetlny (powiększenie obiektywu 4–40x)  
Środek do zatapiania, taki jak Dako Faramount (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel (nr kat. C0563)  
Tkanki o dodatnim i ujemnym odczynie, do stosowania w charakterze próby kontrolnej (zobacz część Kontrola jakości)  
Szkiełka: SuperFrost Plus, powlekane poli-L-lizyną lub Dako Silanized Slides (nr kat. S3003)  
Ksylen, toluen lub substytuty ksylenu

Test SK001 został zoptymalizowany do użycia z automatyzowanym systemem Dako Link. Więcej informacji przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

#### Środki ostrożności - sutek

- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Odczynniki są przeznaczone dla przeszkolonych Użytkowników.
- Opisywany produkt zawiera silnie toksyczny związek — azydek sodu (NaN<sub>3</sub>), w czystej postaci. Stężenie NaN<sub>3</sub> występujące w produkcie nie jest klasyfikowane jako niebezpieczne. Jednak w wyniku reakcji NaN<sub>3</sub> z ołowiem lub miedzią, wchodzącymi w skład instalacji kanalizacyjnych, mogą powstawać silnie wybuchowe azydki metali. Przy usuwaniu resztek odczynnika używać dużych ilości wody do przepłukiwania, aby uniknąć gromadzenia się azydków w instalacji kanalizacyjnej (21).
- Odczynnik blokujący peroksydazę wchodzący w skład zestawu HercepTest™ zawiera nadtlenek wodoru w stężeniu 3%. Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie.
- Wchodzące w skład testu HercepTest™ przeciwciała królicze przeciwko ludzkiemu białku HER2, odczynnik HercepTest™ Visualization Reagent oraz odczynnik do kontroli ujemnej testu HercepTest™ zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego.
- Podobnie jak w przypadku każdego produktu otrzymywanego z materiału biologicznego, należy stosować odpowiednie procedury postępowania.
- Preparaty kontrolne i próbki (przed i po utrwaleniu) oraz wszystkie przyrządy i materiały mające z nimi kontakt, powinny być traktowane jako mogące przenosić zakażenia i likwidowane z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności (22). Nigdy nie pipetować odczynników ustami i unikać narażania skóry i błon śluzowych na kontakt z odczynnikami i próbkami. W razie kontaktu odczynników z wrażliwymi okolicami skóry należy je spłukać obfitą ilością wody.
- Unikać zanieczyszczeń mikrobiologicznych odczynnika. W przeciwnym razie może dojść do nasilenia nieswoistego barwienia.

9. Stosowanie innych od opisanych parametrów czasów inkubacji, temperatur lub metod może powodować błędne wyniki badania. Nadmierne suszenie w temperaturze  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  przez ponad jedną godzinę może spowodować znaczny zanik lub brak immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym (17).
10. Dostarczone odczynniki mają optymalne rozcieńczenia. Zwiększanie rozcieńczenia może powodować utratę odczynu antygenów.
11. Wszystkie odczynniki zostały przygotowane specjalnie do użycia z tym testem. Warunkiem przeprowadzenia testu zgodnie z zaleceniami jest niestosowanie zamienników.
12. Działanie silnego światła może negatywnie wpłynąć na odczynnik HercepTest™ Visualization Reagent oraz na chromogen DAB testu HercepTest™. Nie należy przechowywać składników systemu ani wykonywać barwienia w silnym oświetleniu, takim jak bezpośrednie światło słoneczne.
13. Należy stosować właściwe wyposażenie ochronne, zabezpieczające przed kontaktem odczynnika ze skórą bądź oczami.
14. Niewykorzystany odczynnik należy usuwać zgodnie ze stosownymi przepisami lokalnymi i krajowymi.
15. Zastosowanie objętości odczynników innych niż zalecane może skutkować utratą widocznej immunoreaktywności HER2. Skrawki tkankowe większe niż 22 mm x 22 mm wymagają zastosowania 2–3x 200  $\mu\text{L}$  odczynnika w 2–3 miejscach zautomatyzowanego podania.
16. Chromogen DAB wchodzący w skład zestawu HercepTest™ zawiera  $\geq 75$ – $\leq 90\%$  propano-1,2-diolu,  $\leq 10\%$  roztworu tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzydyny (tetrachlorek bifenylo-3,3',4,4'-tetra-yltetraamonowy) i jest oznaczony jako:

**Niebezpieczeństwo**

- |             |  |
|-------------|--|
| H350        | Może powodować raka.   |
| H341        | Podjeżewa się, że powoduje wady genetyczne.  |
| P201        | Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.  |
| P280        | Stosować rękawice ochronne. Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy. Stosować odzież ochronną.                           |
| P308 + P313 | W PRZYPADKU narażenia lub styczości: Zwrócić się o pomoc lekarską.   |
| P405        | Przechowywać pod zamknięciem.  |
| P501        | Zawartość pojemnika jak i pojemnik utylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, narodowymi i międzynarodowymi przepisami. |
17. Bufor HercepTest™ DAB Substrate Buffer zawiera < 1% imidazolu i jest oznaczony następująco:

**Niebezpieczeństwo**

- |             |   |
|-------------|---|
| H360        | 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 styczości: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.                   |
| P405        | Przechowywać pod zamknięciem.   |
| P501        | Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami. |
18. Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.

Za ogólną regułą należy przyjąć, że osoby poniżej 18 lat nie mogą pracować z tym produktem. Należy poinformować użytkowników testu o prawidłowej procedurze pracy, niebezpiecznych własnościach produktu oraz o niezbędnych instrukcjach BHP (zgodnie z Dyrektywą Europejską 94/33/WE). Dodatkowe informacje znajdują się w Karcie Charakterystyki Bezpieczeństwa Materiału (SDS).

USA: 3,3'-diaminobenzydyna (DAB) może być szkodliwa po przedostaniu się do dróg oddechowych, w kontakcie ze skórą i w razie połknięcia. Substancja działa drażniąco na oczy i skórę. Jeśli doszło do kontaktu ze skórą, należy opłukać miejsca kontaktu wodą z mydłem.

**UWAGA:** Mimo że pod względem struktury diaminobenzydyna jest pokrewna benzydynie, nie ma dowodów na rakotwórcze działanie diaminobenzydyny. Należy przestrzegać lokalnych, stanowych lub federalnych przepisów dotyczących likwidacji.

**Przechowywanie -  
sutek**

Podczas przerwy w używaniu w zautomatyzowanych systemach Dako Link przechowywać w temperaturze 2–8°C. Odczynniki HercepTest™ Peroxidase-Blocking Reagent, HercepTest™ Visualization Reagent, bufor HercepTest™ DAB Substrate Buffer i chromogen HercepTest™ DAB Chromogen należy przechowywać w ciemnym miejscu, w temperaturze 2–8°C.

Nie należy używać zestawu po upływie terminu ważności podanego na opakowaniu zewnętrznym. Jeżeli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane na wkładce informacyjnej do opakowania, Użytkownik powinien sprawdzić ich jakość (14a, 14b). Należy zwrócić uwagę, że również preparaty do kontroli jakości powinny być przechowywane w temperaturze 2–8°C.

Nie ma jednoznacznych oznak świadczących o niestabilności tego produktu. Dlatego równolegle z odczynami na materiale pochodzącym od pacjentów należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne. W wypadku nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych, gdy podejrzewa się problem z testem HercepTest™, należy niezwłocznie skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

## Przygotowanie próbek - sutek

Materiał biopsyjny należy traktować tak, by zachować materiał tkankowy do wykonania odczynów immunocytochemicznych. Do wszystkich preparatów należy stosować standardowe metody przeprowadzania tkanek (15).

*Skrawki zatapiane w parafinie*

Testu można używać do tkanek konserwowanych w obojętnym roztworze buforowanej formaliny lub płynie Bouina, poddanych standardowej obróbce i zatopionych w parafinie. Na przykład materiał biopsyjny należy pociąć na bloczki o grubości 3 lub 4 mm i utrwalać przez 18–24 godzin w obojętnym roztworze buforowanej formaliny. Następnie tkanki poddaje się odwodnieniu, stosując serię kąpeli etanolowych i ksylenowych o stopniowo zmieniającym się stężeniu, po czym przepaja płynną parafiną w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Prawdopodobnie utrwalone i zatopione tkanki wykazujące ekspresję białka HER2 mogą być przed pocięciem na skrawki i zatopieniem na szkiełkach przechowywane w chłodnym miejscu (15–25°C) przez dowolnie długi czas (15,16). W Stanach Zjednoczonych dokument Clinical Laboratory Improvement Act of 1988 (Zmiany w zasadach postępowania w laboratoriach klinicznych, 42 CFR 493.1259(b)) „nakłada na użytkowników wymóg przechowywania wybarwionych szkiełek przez co najmniej 10 lat od daty badania i zachowania bloczków próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania” (16).

Preparaty tkankowe należy pociąć na skrawki o wymiarach 4–5 µm, zatopić w szkiełkach i suszyć na powietrzu w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin (lub do wysuszenia) albo w temperaturze 37°C przez całą noc lub w temperaturze 60°C w ciągu jednej godziny. **PRZESTROGA:** Nadmierne ogrzewanie przez ponad jedną godzinę w temperaturze ≥60°C może spowodować znaczny zanik lub brak immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym (17).

Aby zachować antygenowość, skrawki tkankowe zatopione na szkiełkach (SuperFrost Plus, Poly-L-lysine lub szkiełka silanizowane) powinny zostać poddane barwieniu w ciągu 4–6 tygodni od sporządzenia skrawków, o ile skrawki były przechowywane w temperaturze pokojowej (20–25°C) (18). Preparaty służące do oceny ekspresji białka HER2 i weryfikacji obecności nowotworu należy przygotowywać w tym samym czasie. Zaleca się stosowanie co najmniej 5 szkiełek — 1 do badania obecności nowotworu, 2 do oceny ekspresji białka HER2 (1 szkiełko do inkubacji z przeciwciałami króliczymi przeciwko ludzkiemu białku HER2 i 1 do inkubacji z odczynnikiem Negative Control Reagent) oraz 2 szkiełek zapasowych. Aby zachować antygenowość, skrawki tkankowe zatopione na szkiełkach (SuperFrost Plus, Poly-L-lysine lub szkiełka silanizowane) powinny zostać poddane barwieniu w ciągu 4–6 tygodni od sporządzenia skrawków, o ile skrawki były przechowywane w temperaturze pokojowej (20–25°C) (18).

Z uwagi na brak odpowiednich badań, nie zaleca się stosowania testu HercepTest™ w odwapnionych tkankach.

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowywania próbek przedstawiono w podręczniku Dako „Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods” (19), a także odsyłacze 15 i 16.

*Przygotowanie tkanek do wykonania odczynu*

W celu zapewnienia optymalnego działania testu należy zastosować konkretną metodę odmaskowania antygeny w buforze cytrynianowym o stężeniu 0,01 mol/L. Roztwór do odmaskowania antygeny wchodzi w skład zestawu HercepTest™. Metoda ta polega na ogrzaniu skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach zanurzonych w buforze cytrynianowym o stężeniu 0,01 mol/L (20) w kalibrowanej łaźni wodnej lub zbiorniku Dako PT Link (Wydanie PT101 i PT200) w wymaganej temperaturze (95–99°C). Laboratoria znajdujące się w miejscach położonych wysoko nad poziomem morza powinny określić najlepszą metodą utrzymywania wymaganej temperatury. Przetestowano inne metody odmaskowania antygeny, jednak nie dawały one powtarzalnych wyników. Odstępstwa od opisywanej procedury mogą mieć wpływ na wyniki.

## Przygotowanie odczynników - sutek

Dla wygody zaleca się przygotowanie następujących odczynników przed rozpoczęciem barwienia:

*Epitope Retrieval Solution*

Dla planowanej procedury barwienia rozcieńczyć odpowiednią ilość fiolki 7 (Epitope Retrieval Solution x 10) w stosunku 1:10 używając wody destylowanej lub dejonizowanej. Niewykorzystany rozcieńczony roztwór może być używany przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej lub przechowywany w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

*Bufor płuczący*

Rozcieńczyć odpowiednią ilość roztworu Dako Wash Buffer (nr kat. S3006) w stosunku 1:10 w wodzie destylowanej lub dejonizowanej. Niewykorzystany rozcieńczony bufor może być używany przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej lub przechowywany w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. W przypadku zmętnienia bufor nie nadaje się do użycia. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

*Roztwór substrat-chromogen (DAB)*

W butelkach na odczynniki napełnianych przez użytkownika przygotować roztwór Substrate-Chromogen Solution, dodając 25 µL chromogenu DAB na 1 mL odczynnika DAB Substrate Buffer, i wymieszać. Gotowy roztwór Substrate-Chromogen Solution (DAB) zachowuje trwałość przez około 5 dni, gdy jest przechowywany w temperaturze 2–8°C. Przed użyciem roztwór należy wymieszać. Wytrącanie się osadu nie wpływa na jakość odczynu.

Przed użyciem butelki na odczynniki napełniane przez użytkownika z roztworem Substrate-Chromogen Solution należy zdefiniować w zautomatyzowanych systemach Dako Link. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

**UWAGA:** Barwa roztworu DAB Chromogen może przyjmować odcienie od przejrzystego do jasnofioletowobrazowego. Barwa roztworu nie wpływa na wydajność produktu. Proszę rozcieńczać zgodnie z wytycznymi zawartymi w niniejszej ulotce dołączanej do opakowania. Dodanie nadmiernej ilości roztworu DAB Chromogen do buforu DAB Buffered Substrate spowoduje pogorszenie jakości odczynu dodatniego.

*Barwienie kontrastowe*

Barwny produkt końcowy reakcji barwienia chromogenem DAB jest nierozpuszczalny w alkoholu i wodzie. W charakterze barwnika kontrastowego można wykorzystać odczynnik Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308). Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link. Nie jest wymagane przygotowanie żadnych odczynników.

*Środek do zatapiania*

Zaleca się stosowanie bezwodnego, trwałego środka do zatapiania. Dopuszczalne jest jednak również zatapianie wodne. W przypadku zatapiania wodnego zaleca się stosowanie środka Dako Faramount Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel™ Mounting Medium (nr kat. C0563). Przed użyciem należy przeprowadzić preparat Glycergel w stan ciekły, ogrzewając do temperatury ok. 40 (±5)°C.

**Wykonanie odczynu - sutek***Uwagi dotyczące procedury*

Przed przystąpieniem do wykonania odczynu Użytkownik powinien uważnie przeczytać podane instrukcje i zaznajomić się ze wszystkimi składnikami i oprzyrządowaniem (zobacz część Środki ostrożności).

Podczas wykonywania barwienia nie można dopuścić do wysychania skrawków tkankowych. Wyszuszone skrawki tkankowe mogą powodować nasilenie nieswoistego odczynu.

Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link. Informacje dotyczące wkładania szkiełek mikroskopowych i odczynników oraz programowania przedstawiono w Instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

Jeśli procedura wykonywania odczynu zostanie przerwana, preparaty można przechowywać w roztworze buforu, który tworzy się po inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi, przez maksymalnie jedną godzinę w temperaturze pokojowej (20–25°C) bez wpływu na wyniki odczynu.

*Odparafinowanie i ponowne uwodnienie*

Przed przystąpieniem do wykonania odczynu należy odparafinować preparaty w celu usunięcia środka zatapiającego i ponownego uwodnienia. Należy unikać niecałkowitego usunięcia parafiny. Pozostałości środka zatapiającego powodują nasilenie odczynu nieswoistego. Ten etap powinien być wykonywany w temperaturze pokojowej (20–25°C).

1. Umieścić preparaty w kąpeli ksylenowej i inkubować przez 5 (±1) minut. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
2. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w absolutnym etanolu na 3 (±1) minuty. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
3. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w roztworze etanolu o stężeniu 95% na 3 (±1) minuty. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
4. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w destylowanej lub dejonizowanej wodzie na minimum 30 sekund. Rozpocząć wykonywanie odczynu zgodnie z opisem w części o wykonaniu odczynu zgodnie z obowiązującą procedurą odmaskowania antygenu.

Po wykonaniu barwienia 40 preparatów należy zmienić roztwór ksylenu i alkoholu. Można stosować ksylen lub substytuty ksylenu, takie jak preparat Histoclear.

**UWAGA:** Odczynniki i instrukcje dostarczane w zestawie opracowano w celu uzyskania optymalnych wyników. Dodatkowe rozcieńczenie odczynników bądź nieprzestrzeganie czasu lub temperatury inkubacji może spowodować uzyskanie błędnych lub sprzecznych wyników. Różnice w metodach przetwarzania tkanek oraz procedurach technicznych stosowanych w laboratorium użytkownika mogą spowodować, że wyniki testu nie będą ważną podstawą wyboru pacjentów do terapii lekiem Herceptin™.

*Wykonanie odczynu*

Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu zautomatyzowanego systemu Dako Link. Po odparafinowaniu, ponownym uwodnieniu i odmaskowaniu antygenu aparat przetworzy preparaty zgodnie z protokołem opisanym poniżej.

**Etap 1: Odmaskowanie antygenu**

Napełnić zbiorniki Dako PT Module lub naczynie do barwienia (np. naczynie Coplina) roztworem Epitope Retrieval Solution (zob. opis przygotowania odczynników).

W przypadku zbiornika Dako PT Link (Wydanie PT101 i PT200): Wstępnie ogrzać rozcieńczony roztwór Epitope Retrieval Solution w zbiorniku Dako PT Link do temperatury 85°C. Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie. Włożyć odparafinowane skrawki doprowadzone do temperatury pokojowej do statywu aparatu Autostainer Racks i zanurzyć szkiełka we wstępnie ogrzanym roztworze Epitope Retrieval Solution. Poczekać, aż zbiornik Dako PT Link rozgrzeje się do 97°C i inkubować przez 40 (±1) minut w temperaturze 97°C. Pozostawić skrawki w zbiorniku Dako PT Link do chwili, gdy ostygną do temperatury 85°C. Wyjąć zbiorniki PT Link ze skrawkami z urządzenia Dako PT Link. Pozostawić zbiorniki na stole na ok. 10 minut z otwartą pokrywą w celu dalszego schładzania. Przepłukać skrawki buforem Wash Buffer. Dodatkowe informacje można znaleźć w instrukcji użytkownika systemu Dako PT Link.

W przypadku naczyń Coplina: Umieścić naczynia do barwienia z rozcieńczonym roztworem Epitope Retrieval Solution w łaźni wodnej. Doprowadzić łaźnię wodną z roztworem Epitope Retrieval Solution do temperatury 95–99°C. Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie. Osłonić naczynia pokrywkami w celu ustabilizowania temperatury i eliminacji parowania. Zanurzyć odparafinowane skrawki o temperaturze pokojowej w podgrzanym roztworze Epitope Retrieval Solution znajdującym się w naczyniach do barwienia. **Ponownie podnieść temperaturę łaźni wodnej z roztworem Epitope Retrieval Solution do 95–99°C.** Inkubować przez 40 (±1) minut w temperaturze 95–99°C. Wyjąć naczynie zawierające preparaty z łaźni wodnej. Odczekać 20 (±1) minut w temperaturze pokojowej, aż nastąpi schłodzenie preparatów w roztworze Epitope Retrieval Solution. Zlać roztwór Epitope Retrieval Solution i opłukać skrawki buforem Wash Buffer.

Aby zapewnić optymalną wydajność, po zakończeniu odmaskowania epitopu, a przed rozpoczęciem barwienia, należy zanurzyć skrawki w buforze Wash Buffer na 5–20 minut.

**UWAGA:** Roztwór Epitope Retrieval Solution jest przeznaczony do jednokrotnego stosowania. Nie używać ponownie.



**Etap 2: Wykonanie odczynu**

Po odmaskowaniu antygenu szkiełka zostaną wyjęte z koszyków aparatu i umieszczone w systemach zautomatyzowanych Dako Link. Aparat wykona odczyn, stosując odpowiedni odczynnik, monitorując czas inkubacji i przepłukując szkiełka między kolejnymi odczynnikami. Czasy inkubacji z poszczególnymi odczynnikami są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link.

**Etap 3: Barwienie kontrastowe**

Szkiełka można barwić kontrastowo odczynnikiem Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308). W oprogramowaniu systemu Dako dostępne są 2 protokoły barwienia. W jednym z nich uwzględnione jest barwienie kontrastowe hematoksyliną, a w drugim nie. Czas inkubacji z hematoksyliną jest wstępnie zaprogramowany w protokole uwzględniającym barwienie kontrastowe. Informacje dotyczące programowania protokołów przedstawiono w instrukcji użytkownika systemów Dako Link.

**Etap 4: Zatapianie preparatu**

Zaleca się stosowanie bezwodnego, trwałego środka do zatapiania. Dopuszczalne jest jednak również zatapianie wodne. Do zatapiania i nakrycia preparatów można użyć środka wodnego, takiego jak Dako Faramount (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel™ (nr kat. C0563).

**UWAGA:** Odczyt odczynu można przeprowadzić w dogodnym dla użytkownika momencie. Jednak, jeżeli do nakrywania zastosowano wodny środek do zatapiania, ekspozycja na silne światło przez okres jednego tygodnia może powodować zblaknięcie. Aby ograniczyć blaknięcie, należy przechowywać preparaty w zaciemnionym miejscu, w temperaturze pokojowej (20–25°C).

**Kontrola jakości -  
sutek**

Stosowanie w laboratorium Użytkownika innych metod utrwalania, przeprowadzania i zatapiania tkanek może spowodować istotne różnice wyników, wymagające regularnego wykonywania dodatkowej wewnętrznej kontroli jakości, niezależnie od standardowych załączonych preparatów kontroli jakości Dako. Użytkownicy w Stanach Zjednoczonych powinni zapoznać się z wytycznymi przeprowadzania kontroli jakości zawartymi w dokumencie College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry, CLSI (dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (23), a także z pozycją literaturową 24, która zawiera dodatkowe informacje.

**Tabela 1: Cel codziennej kontroli jakości.**

<i>Rodzaj tkanki: utrwalona i przeprowadzona identycznie jak próbki pochodzące od pacjenta</i>	<i>Swoiste przeciwciała i system detekcji</i>	<i>Nieswoiste przeciwciała* lub bufor plus ten sam system detekcji, co używany z przeciwciałami swoistymi</i>
Kontrola dodatnia: Tkanki lub komórki zawierające antygen docelowy (mogą występować w tkankach pacjenta). Idealna próba kontrolna jest tkanką wykazującą słabo dodatni odczyn i możliwie największą czułość na utratę właściwości przez przeciwciała lub antygeny.	Kontrola wszystkich etapów badania. Weryfikacja odczynnika i procedur stosowanych do odczynu białka HER2.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Kontrola ujemna: Tkanki lub komórki z oczekiwanym ujemnym wynikiem odczynu (mogą występować w tkankach pacjenta lub dodatniej kontroli tkankowej).	Detekcja niepożądanego reakcji krzyżowej przeciwciał z komórkami lub strukturami komórkowymi.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Tkanka pochodząca od pacjenta.	Detekcja odczynu swoistego.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Preparat kontrolny dostarczony przez Dako.	Wyłącznie odczyn z preparatami kontrolnymi.	

\* Surowica od tego samego gatunku i izotypu, co w przypadku przeciwciała pierwotnego, ale nie skierowana przeciwko temu samemu antygenowi. Do wykrywania nieswoistego wiązania przeciwciał, tzn. wiązania fragmentu Fc przeciwciała przez tkankę.

**Preparat kontrolny (w zestawie)**

Każdy z dostarczonych preparatów kontrolnych zawiera trzy odwirowane, utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie ludzkie linie komórkowe raka sutka, dające odczyn o nasileniu 0, 1+ i 3+. W każdej serii należy wykonać odczyn tylko na jednym preparacie kontrolnym. Ocena linii komórkowych preparatów kontrolnych dostarczonych przez Dako pozwala ustalić ważność serii odczynów.

**Tkanka do dodatniej próby kontrolnej**

Preparaty kontrolne należy sporządzić ze świeżych materiałów sekcyjnych, biopsyjnych lub chirurgicznych, możliwie szybko utrwalonych i zatopionych w sposób analogiczny do próbek (próbek) pochodzących od pacjenta. Wynik dodatniej kontroli potwierdza właściwe przygotowanie tkanek i prawidłową technikę barwienia. Dla wszystkich serii odczynów i dla każdego rodzaju warunków badania należy uwzględnić jedną dodatnią kontrolę tkankową.

Tkanki stosowane jako dodatnie próby kontrolne powinny dawać słaby odczyn dodatni, pozwalający na wykrywanie niewielkich zmian czułości przeciwciał pierwotnych. Preparaty kontrolne dostarczane z opisywanym zestawem lub preparaty poddawane obróbce w sposób odmienny od próbek pochodzących od pacjenta pozwalają wyłącznie na weryfikację działania odczynników; preparaty kontrolne nie nadają się do weryfikacji prawidłowego przygotowania tkanek. W charakterze tkanki do kontroli dodatniej najlepiej używać ludzkiej tkanki inwazyjnego (naciekowego) raka sutka, w której uprzednio stwierdzono nadmierną ekspresję białka HER2 z wynikiem 2+.

**UWAGA:** Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania jakości badanych tkanek i odczynników testowych, a NIE pomocniczo do formułowania swoistych rozpoznań próbek pochodzących od pacjentów. Jeżeli nie udaje się potwierdzić dodatniego odczynu w preparatach dodatnich kontroli tkankowych należy uznać, że wyniki preparatów pochodzących od pacjentów są nieważne.

#### *Tkanka do ujemnej próby kontrolnej*

Należy stosować ujemną kontrolę za pomocą tkanki dającej odczyn ujemny, w której nie występują białka HER2. Dla każdej serii odczynów tkanka powinna zostać utrwalona, przeprowadzona i poddana zatopieniu w sposób identyczny do próbki (próbek) pochodzącej od pacjenta, w celu weryfikacji swoistości przeciwciał pierwotnych i identyfikacji swoistego odczynu tła. Tkankami odpowiednimi do ujemnej próby kontrolnej są tkanki okrężnicy, wątroby lub tarczycy. W charakterze wewnętrznej kontroli ujemnej można wykorzystywać różne rodzaje komórek pochodzące z większości tkanek. Preparaty do kontroli ujemnej powinny zostać zweryfikowane przez Użytkownika. W charakterze wewnętrznej kontroli ujemnej można stosować prawidłowe tkanki przewodów sutkowych.

Jeśli tkanka do ujemnej próby kontrolnej lub wewnętrznej kontroli ujemnej daje odczyn swoisty, wyniki dla próbek pochodzących od pacjentów należy uznać za nieważne, a test należy powtórzyć.

Dodatkowe informacje dotyczące przetwarzania preparatów kontrolnych przedstawiono w instrukcji użytkownika systemów Dako Link.

#### *Nieswoisty odczynnik do kontroli ujemnej*

W celu oceny występowania odczynu nieswoistego i ułatwienia interpretacji swoistego odczynu w miejscach występowania antygenów, dla każdego wycinka pochodzącego od pacjenta, w miejsce przeciwciał pierwotnych należy stosować odczynnik do kontroli ujemnej. Czas inkubacji odczynnika Negative Control Reagent powinien odpowiadać czasowi stosowanemu w przypadku przeciwciał pierwotnych.

#### *Weryfikacja odczynu*

Przed pierwszym zastosowaniem systemu do wykonywania odczynów Użytkownik powinien zweryfikować jakość barwienia. W tym celu należy wykonać testy serii wewnętrznych tkanek kontrolnych o znanej charakterystyce odczynów w zakresie IHC, odpowiadających tkankom o dodatnim i ujemnym odczynie. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości omówionymi wcześniej w tej sekcji ulotki oraz z wymaganiami określonymi w dokumentach CAP Certification Program for Immunohistochemistry oraz CLSI (dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (23). Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać z każdą nową partią przeciwciał i za każdym razem, gdy wystąpi zmiana w parametrach odczynu. Do weryfikacji odczynu nadają się tkanki raka sutka dające znany odczyn od 0 do 3+ w kierunku białka HER2, a także tkanki ujemne na obecność tego białka, np. z okrężnicy, wątroby lub tarczycy.

#### **Interpretacja odczynu - sutek**

Wykrywanie nadmiernej ekspresji białka HER2 powinno odbywać się wyłącznie w oparciu o nasilenie odczynu błonowego, który należy oceniać na podstawie skali przedstawionej w Tabeli 2. Oceny preparatów powinien dokonywać patolog, posługując się mikroskopem świetlnym. W celu oceny obecności i nasilenia odczynu immunocytochemicznego należy stosować obiektyw o powiększeniu 10x. Obiektyw o powiększeniu 20–40x jest użyteczny do potwierdzania wyniku. Odczyn cytoplazmatyczny należy uznać za nieswoisty i nie należy go brać pod uwagę przy ocenie nasilenia odczynu błonowego (8). W rozróżnianiu poziomów nasilenia 0, 1+, 2+ i 3+ pomocny jest wydany przez firmę Dako's atlas „HercepTest™ Interpretation Manual – Breast Cancer” (Atlas interpretacji odczynów HercepTest™ - rak sutka), który zawiera obrazy typowych wyników barwienia o różnej intensywności.

Oceniać należy wyłącznie próbki pochodzące od chorych, u których występuje inwazyjny rak sutka. Jeśli w próbce występują jednocześnie komórki raka *in situ* oraz inwazyjnego, należy oceniać wyłącznie składnik inwazyjny.

**Tabela 2: Kryteria oceny nasilenia odczynu błonowego.**

<i>Rodzaj odczynu</i>	<i>Wynik (przekazywany lekarzowi prowadzącemu leczenie)</i>	<i>Wynik testu na nadmierną ekspresję białka HER2 (przekazywane lekarzowi prowadzącemu leczenie)</i>
Brak odczynu lub odczyn błonowy w mniej niż 10% komórek nowotworu.	0	Ujemny
Błady, ledwie rozpoznawalny odczyn błonowy w więcej niż 10% komórek nowotworu. Wybarwione są tylko fragmenty błon poszczególnych komórek.	1+	Ujemny
Słaby/umiarkowany odczyn błonowy (na całych błonach) w więcej niż 10% komórek nowotworu.	2+	Słabo dodatni
Silny odczyn błonowy (na całych błonach) w więcej niż 10% komórek nowotworu.	3+	Silnie dodatni

Wynik testu HercepTest™ w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2 interpretuje się jako ujemny (odczyn o intensywności 0 i 1+), słabo dodatni (intensywność odczynu 2+) albo silnie dodatni (intensywność odczynu 3+). Pacjenci ani lekarze nie powinni wykorzystywać wyników testu HercepTest™ jako podstawy do prognoz; test HercepTest™ nie został zatwierdzony do takich zastosowań.

W każdej serii preparaty należy badać w kolejności podanej w Tabeli 3, co pozwoli na określenie ważności wyników z danej serii oraz półilościową ocenę nasilenia odczynu próbki tkankowej.

Tabela 3: Kolejność oceny preparatów.

<i>Kolejność odczytu preparatów</i>	<i>Uzasadnienie</i>
1. Preparat kontrolny zawierający trzy linie komórkowe.  Preparat kontrolny zawierający trzy linie komórkowe.	Obecność brązowego odczynu błonowego (na obwodzie) o nasileniu 3+ w kontrolnej linii komórkowej 3+ SK-BR-3, brązowego odczynu na części obwodu w kontrolnej linii komórkowej 1+ MDA-175 oraz brak odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 świadczy o prawidłowym przebiegu testu.  W niewielkiej lub umiarkowanej liczbie komórek linii kontrolnej 1+ MDA-175 występuje błonowy odczyn punktowy i nieciągły. W tej linii komórkowej odczyn punktowy można również zaobserwować w cytoplazmie, w rejonie aparatu Golgiego.  Obecność brązowego odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 (ujemnej w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2) wskazuje na wystąpienie nieswoistego odczynu. Wyniki mogą być w takim wypadku nieważne.
2. Preparat z tkanki do dodatniej próby kontrolnej.	Powinien być widoczny brązowy odczyn błonowy. W cytoplazmie i tkankach ujemnych nie powinien występować odczyn silniejszy niż 1+.
3. Preparat tkankowy do ujemnej próby kontrolnej.	<b>BRAK</b> odczynu swoistego w preparacie tkankowym do kontroli ujemnej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórek. Jeżeli w badaniu preparatów tkankowych stanowiących ujemną próbę kontrolną uzyskuje się swoisty odczyn błonowy, wyniki uzyskane dla próbek pochodzących od pacjenta należy uznać za nieważne.
4. Preparat z tkanki pochodzącej od pacjenta poddany działaniu odczynnika do kontroli ujemnej.	Brak swoistego odczynu błonowego potwierdza swoistość znakowania wykrywanego antygenu przez przeciwciała pierwotne.  Inny odczyn jasnobrażowy lub brązowy występujący w cytoplazmie próbki poddanej działaniu odczynnika do kontroli ujemnej, np. w komórkach tkanki łącznej, leukocytach, erytrocytach lub komórkach martwiczych, należy uznać za nieswoisty odczyn tła i zgłosić w rubryce komentarzy na arkuszu danych.
5. Preparat z tkanki pochodzącej od pacjenta poddany działaniu przeciwciała pierwotnego.	Nadmierna ekspresja białka HER2 w próbce objawi się jako brązowe obrzeże na błonie komórek nowotworu, na które zadziałało przeciwciałem pierwotnym.

**1. Preparat kontrolny (w zestawie):** W pierwszej kolejności należy zbadać preparat kontrolny przebadany testem HercepTest™, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność brązowego produktu reakcji (3,3'-diaminobenzyny, DAB) na błonach komórkowych świadczy o reaktywności dodatniej.

Obecność brązowego odczynu błonowego (na obwodzie) w kontrolnej linii komórkowej 3+ SK-BR-3, brązowego odczynu na części obwodu w kontrolnej linii komórkowej 1+ MDA-175 oraz brak odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 świadczy o prawidłowym przebiegu testu. Jeśli którakolwiek z kontrolnych linii komórkowych nie spełnia powyższych kryteriów, wszystkie wyniki uzyskane z próbek pochodzących od pacjentów należy uznać za nieważne.

**2. Tkanka do dodatniej próby kontrolnej:** Następnie należy zbadać preparat dodatniej kontroli tkankowej. Ten preparat służy do potwierdzania skuteczności zastosowanej metody utrwalania i procesu odmaskowania antygenu. Do interpretacji należy wybierać jedynie komórki prawidłowe, gdyż w komórkach z martwicą lub uszkodzonych często występują odczyny nieswoiste (25). W komórkach nowotworu powinien występować brązowy odczyn błonowy. Nasilenie brązowego odczynu cytoplazmatycznego w tkankach ujemnych nie powinno przekraczać wartości 1+.

**3. Tkanka do ujemnej próby kontrolnej:** Tkankę do kontroli ujemnej należy zbadać po tkance do kontroli dodatniej, aby zweryfikować swoistość znakowania antygenu przez przeciwciała pierwotne. Brak odczynu swoistego w preparacie tkankowym do kontroli ujemnej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórek. Jeżeli w badaniu tkanek stanowiących ujemną próbę kontrolną uzyskuje się swoisty odczyn, wyniki uzyskane dla próbki pochodzącej od pacjenta należy uznać za nieważne. W charakterze tkanki do kontroli ujemnej można również wykorzystać ujemne fragmenty preparatu tkankowego do kontroli dodatniej, jednak w takim przypadku wymagana jest weryfikacja przeprowadzona przez użytkownika. Należy zauważyć, że w większości prawidłowych tkanek nabłonkowych może występować słaba reakcja (odczyn o nasileniu 0 – 1+). Do użycia w charakterze kontroli ujemnej nadają się np. tkanki: okrężnicy, wątroby i tarczycy.

Jeśli odczyn nieswoisty występuje, ma on charakter rozproszony (rozlany). W preparatach tkanek poddawanych nadmiernemu utrwalaniu w formalinie może niekiedy występować odczyn w obrębie tkanki łącznej.

**4 + 5. Tkanka pochodząca od pacjenta:** Na końcu należy zbadać próbki pochodzącej od pacjenta, poddane działaniu testu HercepTest™. Intensywność odczynu dodatniego należy oceniać w kontekście nieswoistego odczynu tła występującego w próbce z odczynnikiem kontroli ujemnej. Podobnie jak w każdym badaniu immunocytochemicznym, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, a nie że nie występował w badanych komórkach/tkankach. Konkretnie informacje na temat immunoreaktywności testu HercepTest™ można znaleźć w sekcji Streszczenie i wyjaśnienia, Ograniczenia oraz Charakterystyka wydajnościowa.

#### **Dodatkowe zalecenia dotyczące interpretacji odczynu w teście HercepTest™**

W testach większości tkanek przerzutowego raka sutka badanych w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2 uzyskuje się wynik od 0 do 3+. W większości przypadków wynik jest bardzo jednoznaczny, jednak niewielki odsetek próbek z wynikiem 1+ i 2+ może nastrojać trudności interpretacyjnych. Poniżej wymieniono wskazówki dotyczące interpretacji odczynu w teście HercepTest™.

1. Ocenić kontrolne linie komórkowe w celu zweryfikowania działania testu.
2. Ocenić preparaty do kontroli dodatniej i ujemnej.

3. Przy pierwszej ocenie zaleca się wybarwienie preparatu tkankowego hematoksylina i eozyną (H+E). (Charakter nowotworowy może nie być jednoznacznie widoczny w próbkach wybarwionych testem HercepTest™. Patolog, który ma zweryfikować obecność komórek nowotworowych, powinien otrzymać preparat wybarwiony H+E.) Test HercepTest™ należy wykonać na parze (serii) skrawków pochodzących z tego samego bloku parafinowego próbki.
4. Skrawki, na których wykonano odczyn w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2, należy najpierw badać w małym powiększeniu. Większość przypadków dodatnich będzie ewidentnie rozpoznawalna przy małym powiększeniu.
5. Do ustalania odsetka dodatnich komórek nowotworowych należy wykorzystać dobrze zachowane i dobrze wybarwione obszary próbki.
6. Z reguły wynik testu powinien być oczywisty przy małym powiększeniu. Jeśli rozróżnienie przypadków granicznych 1+/2+ przy niewielkim powiększeniu jest utrudnione, to zwykle wynik wynosi 1+.
7. W celu potwierdzenia odczynu błonowego należy przeprowadzić oględziny przy 20- lub 40-krotnym powiększeniu na obiektywie.
8. Jeśli w większości komórek nowotworu występuje odczyn na całej błonie komórkowej, to wynik wynosi 2+ lub 3+. Aby potwierdzić wynik, należy przeprowadzić oględziny przy 20- lub 40-krotnym powiększeniu na obiektywie.
9. W większości przypadków 3+ co najmniej 80% komórek nowotworowych daje odczyn, zaś odczyn błonowy jest intensywny.
10. Jeśli odsetek nowotworowych komórek dodatnich w próbce jest bliski granicznej wartości 10%, zaleca się zliczenie co najmniej 100 komórek nowotworowych w celu określenia prawidłowego odsetka komórek wybarwionych.
11. Jeśli w więcej niż 10% komórek nowotworowych występuje słaby lub umiarkowany odczyn błonowy (na całym obwodzie), to wynik dla próbki wynosi 2+. Zwykle towarzyszy mu odczyn na fragmentach obwodu błon większości pozostałych komórek nowotworowych.
12. Jeśli odczyn na całym obwodzie błon komórkowych występuje w mniej niż 10% komórek nowotworowych, przy odczynie na niepełnym obwodzie innych komórek nowotworowych, wynik wynosi 1+.
13. Jeśli odczyn błonowy (na całym obwodzie lub na części obwodu) występuje w mniej niż 10% komórek nowotworowych, wynik wynosi 0.

## Ograniczenia ogólne - sutek

1. Immunocytochemia jest wieloetapową metodą diagnostyczną wymagającą specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, wyborze tkanek, utrwalaniu i przeprowadzaniu, przygotowaniu preparatów do immunocytochemii i interpretacji wyników barwienia.
2. Wybarwienie tkanek jest uzależnione od obróbki i przetworzenia tkanki przed wykonaniem odczynu. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie lub zanieczyszczenie skrawków domieszką innych tkanek lub płynów może powodować artefakty, ukrycie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Przyczyną sprzecznych wyników może być stosowanie zmiennych metod utrwalania i zatapiania lub właściwości zależne od tkanek.
3. Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
4. Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być prowadzona w kontekście objawów klinicznych, morfologicznych i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być uzupełniona przez badania morfologiczne, wykonywanie odpowiednich prób kontrolnych i innych badań diagnostycznych. Odpowiedzialność związana z interpretacją wybarwionego preparatu spoczywa na wykwalifikowanym histopatologu, dysponującym doświadczeniem obejmującym stosowane przeciwciała, odczynniki i metody. Barwienie należy wykonać w akredytowanej pracowni histopatologicznej, pod nadzorem histopatologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów i właściwe wykonanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych.
5. Tkanki pochodzące od osób z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie w reakcji z peroksydazą chrzanową (26).
6. W typach tkanek, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji w przetestowanych tkankach z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworów i innych tkankach zmienionych chorobowo (27). W przypadku uzyskania nieoczekiwanych reakcji należy przesłać odpowiednią dokumentację do działu wsparcia technicznego firmy Dako.
7. Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Wyniki fałszywie dodatnie mogą również wystąpić na skutek aktywności podobnej do peroksydazy (erytrocyty) i endogennej aktywności peroksydazy (cytochromu C) (27).
8. Odczyn będzie wykonywany w zaprogramowanej temperaturze (20–25°C).

## Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu - sutek

1. Antygen obecny w linii komórkowej 1+, MDA-175, z czasem ulega rozkładowi. Odczyn preparatu kontrolnego należy oceniać w kontekście daty ważności tego preparatu. Ujemny odczyn komórek MDA-175 może być jedynie objawem rozkładu preparatu. Preparaty kontrolne muszą być przechowywane w temperaturze 2–8°C.
2. Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygeny w tkankach. Jeżeli próbki przechowywano w temperaturze pokojowej (20–25°C), powinny być poddane barwieniu w ciągu 4–6 tygodni od zatopienia preparatów tkankowych na szkiełkach (28).
3. Nie wolno zastępować odczynników znajdujących się w zestawie odczynnikami posiadającymi inne numery partii lub odczynnikami innych producentów.
4. Ocena odczynu cytoplazmatycznego może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników. W interpretacji należy brać pod uwagę wyłącznie nasilenie odczynu błonowego.
5. Barwione preparaty kontrolne należy stosować wyłącznie w celu weryfikacji wyników serii odczynów, a *nie* w celu oceny odczynu w skrawkach tkankowych.
6. Możliwe jest sporadyczne występowanie silnego (3+) odczynu ogniskowego. Może to być efektem nierównomiernego utrwalenia i/lub przetwarzania tkanki. Zaleca się wykonanie odczynu drugiego bloczka tkanki z tej samej próbki.
7. Nie zweryfikowano użycia testu HercepTest™ do próbek utrwalanych w środkach innych niż obojętny roztwór buforowanej formaliny i płyn Bouina.
8. Komórki prawidłowego nabłonka sutka powinny dawać odczyn o intensywności od 0 do 1+. W razie zaobserwowania w prawidłowym nabłonku odczynu silniejszego niż 1+ należy powtórzyć test. Uwaga: prawidłowy nabłonek migdałków i przełyku może dawać odczyn o intensywności dochodzącej do 2+.

Charakterystyka  
wydajnościowa - sutek*Dodatkowe informacje*

Test do badań klinicznych (CTA, ang. clinical trial assay) używany do kwalifikacji pacjentów do badań nad lekiem Herceptin™ był przeznaczony do badań naukowych i nie jest już dostępny. Test HercepTest™ opracowano jako porównywalny test alternatywny w stosunku do testu używanego w badaniach klinicznych.

Bezpieczeństwo i skuteczność leku Herceptin™ badano w randomizowanym kontrolowanym badaniu klinicznym oraz w badaniu otwartym (zob. ulotka dołączona do opakowania leku Herceptin™). U wszystkich pacjentów wybranych do badań klinicznych leku Herceptin™ test CTA zastosowany w laboratorium centralnym wykazał nadmierną ekspresję białka HER2. Pacjenci kwalifikowali się do leczenia lekiem Herceptin™, jeśli w ich komórkach nowotworowych stwierdzono nadmierną ekspresję białka HER2 na poziomie 2+ lub 3+ (w skali 0–3+, gdzie 3+ oznacza najwyższy poziom).

Analiza podgrup wyników tych badań nasuwa wniosek, że u pacjentów, których tkanki dają silnie dodatni (3+) wynik w teście na nadmierną ekspresję białka HER2, stosowanie leku Herceptin™ może odnieść lepszy skutek niż u pacjentów, których tkanki dają wynik słabo dodatni (2+). Stopień nadmiernej ekspresji białka HER2 jest potencjalnie ważnym wskaźnikiem pozwalającym na przewidzenie skuteczności leczenia lekiem Herceptin™. Ponieważ żadnego z pacjentów uczestniczących w badaniach leku Herceptin™ nie zakwalifikowano do tych badań na podstawie wyniku testu HercepTest™, nie jest znana korelacja między wynikami dodatnimi a prawdopodobieństwem klinicznej skuteczności leczenia lekiem Herceptin™.

*Badania porównawcze*

W celu określenia charakterystyki testu HercepTest™ przeprowadzono dwa badania.

- 1) Porównanie z testem używanym w badaniach klinicznych (CTA).
- 2) Dokładność w porównaniu z pięcioma innymi testami.

*Porównanie z testem używanym w badaniach klinicznych (CTA)*

HercepTest™ porównywano z testem używanym do identyfikacji pacjentów kwalifikujących się do leczenia lekiem Herceptin™. W porównaniu użyto 274 HER2-dodatnich (2+ lub 3+) próbek tkanki raka sutka oraz identycznej liczby próbek HER2-ujemnych. W Tabeli 4 przedstawiono wyniki w macierzy 2 x 2, przy czym wyniki 0 i 1+ uznano za ujemne, a 2+ i 3+ uznano za dodatnie.

**Tabela 4: Macierz 2 x 2 zgodności między testem HercepTest™ a testem CTA (podano liczby próbek).**

		CTA: test używany w badaniach klinicznych		Razem
		Dodatni	Ujemny	
HercepTest	Dodatni	216	59	275
	Ujemny	58	215	273
Razem		274	274	548

Zgodność: 79%, przy 95-procentowym przedziale ufności (76–82%).

Ogólna zgodność par wyników testu HercepTest™ i CTA wynosiła 79% (431/548), przy 95-procentowym dwustronnym przedziale ufności 76–82%. W dwudziestu jeden procent (21%) testów badane metody dały wyniki rozbieżne.

Wynik testu HercepTest™ w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2 wyrażony jest w skali 0–3+ i interpretowany jako ujemny (odczyn o intensywności 0 i 1+), słabo dodatni (intensywność odczynu 2+) albo silnie dodatni (intensywność odczynu 3+).

**Tabela 5: Macierz 3 x 3 zgodności między testem HercepTest™ a testem CTA.**

		CTA: test używany w badaniach klinicznych			Razem
		3+	2+	0 - 1+	
HercepTest	3+	107	36	6	149
	2+	16	57	53	126
	0 - 1+	8	50	215	2 3
Razem		131	143	274	548

Macierz 3 x 3 opracowana na podstawie wyników badań zgodności ujawnia wysokie prawdopodobieństwo odpowiedniości między odczytem 3+ w teście HercepTest™ a dodatnim wynikiem testu CTA (2+ lub 3+), który kwalifikowałby do włączenia do badań klinicznych nad lekiem Herceptin™. Wyniki 2+ w teście HercepTest™ nie były równie dobrze skorelowane z wynikami testu badawczego. Około 42% (53/126) wyników 2+ w teście HercepTest™ 2+ odpowiadało ujemnym wynikom testu badawczego (0–1+), które nie spełniają kryteriów włączenia do badań klinicznych leku Herceptin™.

**Dokładność**

HercepTest™ testowano również na 2 szkiełkach mikroskopowych zawierających zatopione w parafinie skrawki tkankowe z 168 nowotworów sutka. Nowotwory te przebadano wcześniej pięcioma różnymi metodami w celu określenia amplifikacji genu GER2 i nadmiernej ekspresji białka HER2, w tym wewnętrznie metodą Southern Blot, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w celu amplifikacji DNA, poprzez analizę RNA metodą Northern Blot, metodą Western Blot oraz metodą immunocytochemiczną (ICC) na skrawkach mrożakowych (28). Odpowiednie wyniki przedstawiono w Tabeli 6.

**Tabela 6: Porównanie wyników testu HercepTest™ z wynikami zbiorczymi (OE) testów na amplifikację genu i nadmierną ekspresję białka HER2.**

		Referencyjna klasyfikacja OE		Razem
		+	-	
HercepTest	+	43	0	43
	-	26	99	125
Razem		69	99	168

Zgodność wyników dodatnich: 43/69 = 62%

Zgodność wyników ujemnych: 99/99 = 100%

Wyniki wskazują na zgodność na poziomie 85% (142/168) (przy 95-procentowym przedziale ufności 78–89%) między odczynami dodatnimi (2+ i 3+) a ujemnymi (0 i 1+) w teście HercepTest™. Żadna z próbek dająca wynik ujemny w testach prowadzonych 5 różnymi metodami nie dała wyniku dodatniego w teście HercepTest™, natomiast w łącznych wynikach 5 różnych metod więcej jest przypadków dodatnich.

**Powtarzalność***Powtarzalność w jednej serii odczynów*

Powtarzalność w ramach jednej serii odczynów testowano w jednym laboratorium na 5 próbkach dających odczyn immunocytochemiczne o różnym nasileniu. Każda próbka była badana trzykrotnie w randomizowanej próbie ślepej. Odczyn wykonywano metodą automatyczną. Dla wszystkich próbek uzyskano 100% powtarzalność wyników.

*Powtarzalność między seriami odczynów*

Powtarzalność między seriami odczynów testowano przez 4 dni w trzech laboratoriach na 5 próbkach dających odczyty immunocytochemiczne o różnym nasileniu. Przeprowadzono randomizowaną próbę ślepa, w której odczyny wykonywane były techniką automatyczną. Stwierdzono doskonałą powtarzalność wyników dodatnich i ujemnych (0 i 1+ oraz 2+ i 3+), z wyjątkiem dwóch próbek w jednym laboratorium, dla których uzyskano rozbieżne wyniki 1+ i 2+. Dla próbek z wynikami 2+ i 3+ stwierdzono 100% powtarzalność.

*Powtarzalność międzylaboratoryjna*

Powtarzalność między pracowniami testowano w trzech pracowniach położonych w różnych obszarach geograficznych, przy użyciu 40 identycznych randomizowanych i maskowanych preparatów zawierających tkanki o różnych nasileniach odczynu immunocytochemicznego. Świeżo przygotowane preparaty przesłano do każdej z pracowni w celu wykonania odczynów automatycznych oraz oceny przez histopatologa. Wyrażona procentowo zgodność międzylaboratoryjna pod względem rozróżnienia między wynikami dodatnimi/ujemnymi wynosiła od 83% do 90%, przy czym za wynik ujemny uznawano odczyn o nasileniu 0 lub 1+, a za dodatni — odczyn o nasileniu 2+ lub 3+. W porównaniu z wynikami uzyskanymi w laboratorium referencyjnym, które wykonywało testy w badaniach klinicznych (CTA), dla 12,5% (15/120) wyników zaszła rozbieżność między kwalifikacją ujemną (0 lub 1+) a dodatnią (2+ lub 3+). Dodatkowo w 10% (12/120) wyników zachodziła rozbieżność między nasileniem 2+ a 3+.

*Immunoreaktywność*

W Tabeli 7 przedstawiono zbiorcze informacje na temat immunoreaktywności testu HercepTest™ z zalecanym panelem tkanek prawidłowych. Wszystkie preparaty utrwalano w formalinie i zatapiano w parafinie. Następnie wykonywano odczyn przy użyciu testu HercepTest™, zgodnie z zaleceniami przedstawionymi w ulotce dołączonej do opakowania.

Tabela 7. Zestawienie reaktywności testu HercepTest™ dla tkanek normalnych.

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Składniki tkankowe dające odczyn dodatni oraz rodzaj odczynu
Nadnercza (3)	Brak
Szypik kostny (3)	Brak
Mózg/mózdzek (3)	Brak
Mózg/mózgowie (3)	Brak
Gruczoły sutkowe (3)	Gruczoł sutkowy, nabłonek przewodowy (2 tkanki z 3, nasilenie odczynu 1+, > 10% komórek, częściowy odczyn błonowy)
Szyjki macicy (3)	Brak
Okreźnica (3)	Brak
Przełyk (3)	Brak
Serce (3)	Brak
Nerki (3)	Brak
Wątroba (3)	Brak
Płuca (3)	Brak
Komórki międzybłonka (3)	Brak
Jajniki (3)	Brak
Trzustka (3)	Brak
Przytarczyce (3)	Komórki główne (komórki oksyfilne, 2 tkanki z 3, nasilenie odczynu 1+, > 50% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny)
Nerwy obwodowe (3)	Brak
Przysadka mózgowa (3)	Brak
Gruczoł krokowy (3)	Brak
Ślinianki (3)	Brak
Mięśnie szkieletowe (3)	Brak
Skóra (3)	Brak
Jelito cienkie (3)	Nabłonek warstwy podstawnej (2 tkanki z 3, nasilenie odczynu 1-2+, > 10% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny)
Śledziona (3)	Brak
Żołądek (3)	Brak
Jądra (3)	Komórki główne (1 tkanka z 3, nasilenie odczynu 1-2+, > 10% komórek, odczyn cytoplazmatyczny)
Grasica (3)	Brak
Tarczycyca (3)	Brak
Migdałki (3)	Brak
Macica (3)	Brak
	Komórki nabłonka gruczołowego (2 tkanki z 3, nasilenie odczynu 0-1+, > 50% komórek, odczyn cytoplazmatyczny)

O ile nie zaznaczono inaczej, we wszystkich tkankach stwierdzano odczyn błonowy. O ile nie zaznaczono inaczej, wszystkie trzy próbki każdego rodzaju tkanki dawały odczyn o tym samym nasileniu.

#### Rozwiązywanie problemów - sutek

Informacje na temat środków zaradczych można znaleźć we wspomnianym powyżej podręczniku (19) firmy Dako; aby zgłosić nietypowy odczyn, należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

<i>Problem</i>	<i>Prawdopodobna przyczyna</i>	<i>Zalecane postępowanie</i>
1. Brak barwienia preparatów.	1a. Błąd programowania. Odczynniki nie są używane we właściwej kolejności. 1b. Obecność azydru sodu w roztworze płuczającym. 1c. Nadmierne ogrzewanie skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach przed odparafinowaniem i ciepłym odmaskowaniem antygenu może doprowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności HER2.	1a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy wybrano właściwy program. 1b. Używać tylko roztworu Dako Wash Buffer, nr kat. S3006. 1c. Pozostawić na powietrzu skrawki tkankowe w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin lub do całkowitego wysuszenia. Lub suszyć w temperaturze 37 °C przez noc albo suszyć w temperaturze 60 °C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła (17).

<i>Problem</i>	<i>Prawdopodobna przyczyna</i>	<i>Zalecane postępowanie</i>
2. Słabe barwienie preparatów.	2a. Niedostateczne odmaskowanie antygeny.	2a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy prawidłowo przeprowadzono odmaskowanie antygeny.
	2b. Niedostateczny czas inkubacji.	2b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji odczynników były prawidłowe.
	2c. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	2c. Dopilnować, by tkanki pacjenta nie były poddawane nadmiernemu utrwalaniu i nie stosować alternatywnych substancji utrwalających.
	2d. Nadmierne ogrzewanie skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach przed odparafinowaniem i ciepłym odmaskowaniem antygeny może doprowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności HER2	2d. Pozostawić na powietrzu skrawki tkankowe w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin lub do całkowitego wysuszenia. Lub suszyć w temperaturze 37 °C przez noc albo suszyć w temperaturze 60 °C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła (17).
	2e. Naniesiono niedostateczną objętość odczynnika.	2e. Sprawdzić wielkość skrawka tkankowego (22 mm x 22 mm) i naniesioną objętość odczynnika.
3. Nadmierne barwienie tła w preparatach.	3a. Niecałkowicie usunięta parafina.	3a. Stosować świeże roztwory do odparafinowania.
	3b. Podczas zatapiania skrawków zastosowano pochodne skrobi.	3b. Unikać stosowania zawierających skrobię dodatków zwiększających przyczepność skrawków do szkiełek mikroskopowych. Wiele dodatków wykazuje immunoreaktywność.
	3c. Preparaty nie są odpowiednio przepłukiwane.	3c. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy preparaty były odpowiednio płukane.
	3d. Wysychanie skrawków podczas wykonywania odczynu.	3d. Dopilnować, by na szkiełka były nanoszone odpowiednie objętości odczynnika.
	3e. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	3e. Stosować tylko zatwierdzone środki utrwalające. Alternatywne środki utrwalające mogą powodować silny odczyn tła.
	3f. Nieswoiste wiązanie odczynników do tkanki.	3f. Sprawdzić metodę utrwalania próbki oraz wykluczyć obecność tkanek martwiczych w próbce.
4. Tkanka oddziela się od szkiełka.	4a. Zastosowano niewłaściwe szkiełka mikroskopowe.	4a. Używać szkiełek silanizowanych, takich jak Dako Silanized Slides, (nr kat. S3003), SuperFrost Plus lub szkiełek powlekanych poli-L-lizyną.
5. Nadmierne silny odczyn swoisty.	5a. Użyto niewłaściwej metody utrwalania.	5a. Dopilnować, by były stosowane jedynie odpowiednie substancje utrwalające i metody utrwalania
	5b. Zbyt długie czasy inkubacji odczynników.	5b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji odczynników były prawidłowe.
	5c. Użyto niewłaściwego roztworu płuczącego.	5c. Używać tylko roztworu Dako Wash Buffer, nr kat. S3006.
6. Słaby odczyn kontrolnej linii komórkowej 1+.	6a. Zastosowano nieprawidłowy protokół odmaskowania antygeny.	6a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy prawidłowo przeprowadzono odmaskowanie antygeny.
	6b. Brak reakcji z roztworem substratu-chromogenu (DAB).	6b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy chromogen został prawidłowo przygotowany. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji chromogenu były prawidłowe.
	6c. Rozkład preparatu kontrolnego.	6c. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu podane na zewnątrz opakowania.
7. Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie.	7. Po ogrzaniu roztworu pojawia się zmętnienie.	7. Jest to normalne zjawisko, które nie ma wpływu na wynik barwienia.



- 
- |   |  |   |
|---|--|---|
| 8. Przy przechowywaniu (przed ogrzaniem) roztwór Epitope Retrieval Solution jest mętny. | 8. Roztwór był nieprawidłowo przechowywany lub jest przeterminowany. | 8. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu podane na zewnątrz opakowania. Usunąć roztwór epitope retrieval solution. |
|---|--|---|
- 

**UWAGA:** Jeśli problemu nie daje się przypisać żadnej z powyższych przyczyn, bądź jeśli zalecane postępowanie jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Dako w celu uzyskania dalszej pomocy.

Dodatkowe informacje na temat technik wykonywania odczynów i przygotowywania próbek można znaleźć we wspomnianym wcześniej podręczniku (19) (dostępnym w firmie Dako), atlasie Atlas of Immunohistology (29) oraz publikacji Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis (30).

---

## Streszczenie i informacje ogólne - żołądek

## Dodatkowe informacje

Ludzki gen *HER2* (znany także jako *ERBB2* lub *NEU*) koduje białko oznaczane najczęściej symbolem HER2 lub p185<sup>HER2</sup>. Białko HER2 to transbłonowe białko receptorowe o aktywności kinazy tyrozynowej, wykazujące homologię do receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1) (1-8). Białko HER2 jest składnikiem prawidłowym, wykazującym ekspresję w różnych typach komórek nabłonkowych (8).

Nadmierną ekspresję białka HER2 i amplifikację genu *HER2* raka żołądka wykazano w licznych badaniach (31). Wynik dodatni HER2 wykryto w ok. 20 % pacjentów w zakresie IHC lub FISH (31). Przedkliniczne badania *in vitro* i *in vivo* wykazały skuteczność preparatu trastuzumab (Herceptin™) na przykładzie różnych modeli raka żołądka, co doprowadziło do rozpoczęcia wielu badań klinicznych (31-35). W fazie III badania BO18255 zwanym ToGA, pacjentów z dodatnim HER2 z nieoperacyjnym miejscowo zaawansowanym gruczolakorakiem żołądka i/lub przerzutowym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego randomizowano do przyjmowania preparatu 5-FU lub capecytabiny i cisplatin oddzielnie lub w połączeniu z preparatem trastuzumab. Znaczny statystyczny wzrost okresu przeżycia (OS) u pacjentów biorących udział w leczeniu preparatem trastuzumab i chemioterapią (36, 37). Herceptin™ (trastuzumab) to „uczłowieczone” przeciwciało monoklonalne (10), które wiąże się z białkiem HER2, wykazując do niego silne powinowactwo. W badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że przeciwciało to blokuje rozrost ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadmierną ekspresję białka HER2 (32-35).

## Właściwości

Badaniu przesiewowemu pod kątem statusu HER2, w celu włączenia do badania ToGA poddano 3803 pacjentów. W tym badaniu zaobserwowano nadmierną ekspresję białka HER2 na przykładzie metody IHC (HercepTest™, Dako) i aplikację genu HER2 na przykładzie metody FISH (HER2 FISH pharmDx™, Dako). Ważne wyniki testów uzyskano dla 3665 próbek w testach IHC lub FISH i dla 3280 próbek w obu testach.

Wyniki badania ToGA wykazały, że 22,1% pacjentów z zaawansowanym rakiem żołądka było HER2-pozytywnych przy użyciu metody IHC lub FISH, zgodnie z definicją kryteriów selekcji ToGA HER2 (37).

Więcej informacji na temat użycia preparatu HercepTest™ przy wspomaganiu badania pacjentów, u których rozważane jest podjęcie leczenia lekiem trastuzumab można znaleźć w ulotce dołączonej do opakowania Herceptin™).

## Zasada testu - żołądek

Test HercepTest™ zawiera odczynniki potrzebne do wykonania dwuetapowej procedury barwienia immunocytochemicznego na standardowo przetworzonych próbkach zatopionych w parafinie. W omawianym zestawie po zakończeniu inkubacji pierwotnych przeciwciał króliczych z ludzkim białkiem HER2 następuje reakcja z gotowym barwnym odczynnikiem Visualization Reagent produkowanym w oparciu o technologię stosowaną do wytwarzania dekstranu. W skład odczynnika wchodzi cząsteczki wtórnych przeciwciał kozich skierowanych przeciw immunoglobulinom króliczym oraz cząsteczki peroksydazy chrzanowej połączone ze wspólnym szkieletem polimerowym dekstranu. W ten sposób wyeliminowano konieczność sekwencyjnego stosowania przeciwciała wtórnego i koniugatu peroksydazy. Reakcję krzyżową odczynnika Visualization Reagent z immunoglobulinami ludzkimi i płodową surowicą cielęcą wyeliminowano poprzez absorpcję w fazie stałej. Po dodaniu chromogenu następuje reakcja enzymatyczna, której efektem jest widoczny produkt, zlokalizowany w miejscu występowania antygeny. Następnie można wykonać barwienie kontrastowe i nakryć preparat szkiełkiem nakrywkowym. Wynik reakcji ocenia się w mikroskopii świetlnej. Zestaw zawiera szkiełka kontrolne zawierające trzy utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie ludzkie linie komórkowe raka sutka, dające odczyny o nasileniu odpowiednio 0, 1+ i 3+. Służą one do weryfikacji serii odczynów. Nasilenie odczynu tych linii komórkowych jest skorelowane z liczbą receptorów przypadających na komórkę.

HercepTest™ for Automated Link Platforms, nr kat. SK001, jest przeznaczony do zautomatyzowanego wykonywania odczynu za pomocą zautomatyzowanego systemu Dako Automated Link.

## Dostarczane materiały - żołądek

## Nr kat. SK001

Wyszczególnione poniżej materiały wystarczają na wykonanie 50 testów (50 szkiełek mikroskopowych inkubowanych z odczynnikiem przeciwciałem pierwotnym przeciwko białku HER2 oraz 50 szkiełek inkubowanych z odpowiednim odczynnikiem do kontroli ujemnej). Obliczając liczbę testów przyjęto, że zużycie wynosi 200 µL odczynnika na sekcje tkanki (22 mm x 22 mm) (z wyjątkiem Epitope Retrieval Solution). Materiał znajdujący się w zestawie wystarcza na wykonanie co najwyżej 10 pojedynczych serii oznaczeń.

Ilość

Opis

1 x 22 mL


**HercepTest™ Peroxidase-Blocking Reagent**

3% roztwór nadtlenu wodoru z dodatkiem azydku sodu (NaN<sub>3</sub>) w stężeniu 15 mmol/L.

1 x 12 mL


**HercepTest™ Rabbit Anti-Human HER2 Protein**

Gotowe do użycia przeciwciała wyizolowane ze względu na powinowactwo. Dostarczany w buforze Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN<sub>3</sub> 15 mmol/L, pH 7,2, z dodatkiem białka stabilizującego.

Immunogen: syntetyczny fragment C-końcowy (część wewnątrzcytoplazmatyczna) białka HER2 sprzężony z KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

Swoistość: białko HER2.

Metoda oczyszczania: przeciwciała są izolowane ze względu na powinowactwo przy użyciu immobilizowanego peptydu białka HER2.

1 x 22 mL


**HercepTest™ Visualization Reagent**

Polimer dekstranowy skoniugowany z peroksydazą chrzanową oraz przeciwciała kozie izolowane ze względu na powinowactwo, skierowane przeciw antygenom króliczym. Dostarczany w buforze Tris/HCl zawierającym białko stabilizujące i środek przeciwbakteryjny.

1 x 10 mL	<b>HercepTest™ NEGATIVE CONTROL REAGENT</b>
	<b>HercepTest™ Negative Control Reagent</b> Frakcja immunoglobulinowa prawidłowej surowicy króliczej rozcieńczona do takiego samego stężenia białek, jak przeciwciała przeciwko białku HER2. Dostarczany w buforze Tris/HCl 0,05 mol/L, NaCl 0,1 mol/L, NaN <sub>3</sub> 15 mmol/L, pH 7,2, z dodatkiem białka stabilizującego.
2 x 22 mL	<b>HercepTest™ DAB SUBSTRATE BUFFER</b>
	<b>HercepTest™ DAB Substrate Buffer</b> Roztwór buforowy substratu, pH 7,5, zawierający roztwór nadtlenu wodoru o stężeniu < 0,1 %, substancje stabilizujące, substancje wzbogacające i środek przeciwbakteryjny.
1 x 1 mL	<b>HercepTest™ DAB CHROMOGEN</b>
	<b>HercepTest™ DAB Chromogen</b> Roztwór tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzyny o stężeniu 5% w roztworze chromogenu
3 x 500 mL	<b>HercepTest™ EPITOPE RETRIEVAL SOLUTION (CONTAINING DETERGENT) (10x)</b>
	<b>HercepTest™ Epitope Retrieval Solution (Containing Detergent) (10x)</b> Roztwór cytrynianowy o stężeniu 0,1 mol/L z dodatkiem środka przeciwbakteryjnego.
2 x 5 szkiełek	<b>HercepTest™ CONTROL SLIDES</b>
	<b>HercepTest™ Control Slides</b> Każdy preparat zawiera skrawki trzech utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie linii komórkowych raka sutka wykazujących różne poziomy ekspresji białka HER2: MDA-231 (0), MDA-175 (1+) oraz SK-BR-3 (3+). Preparaty do kontroli jakości zostały poddane obróbce cieplnej w celu uzyskania lepszego przylegania skrawków do szkiełek. Jakakolwiek dodatkowa obróbka cieplna preparatów do kontroli jakości przeprowadzona w celu poprawy przylegania skrawków do szkiełek może negatywnie wpłynąć na wyniki odczynu.
10 x butelek	<b>USER-FILLABLE REAGENT BOTTLE 12 mL CAPACITY</b>
	<b>Butelka na odczynnik napełniana przez użytkownika, pojemność 12 ml</b> Każda butelka może zawierać 12 mL odczynnika. Butelki te są przeznaczone do mieszania i przechowywania roztworu Substrate-Chromogen Solution (patrz także część Przygotowanie odczynników).

**UWAGA:** Wszystkie odczynniki zostały przygotowane specjalnie do użycia z tym testem. Warunkiem przeprowadzenia testu zgodnie z zaleceniami jest niestosowanie zamienników.

#### Materiały wymagane, ale niedostarczane - żołądek

#### Bufor płuczący Dako Wash Buffer (nr kat. S3006)

Barwnik kontrastowy: hematoksylina, na przykład Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308)

Szkiełka nakrywkowe

Woda destylowana lub dejonizowana

Suszarka umożliwiająca utrzymanie temperatury 60°C lub niższej

Etanol absolutny i roztwór o stężeniu 95%

Mikroskop świetlny (powiększenie obiektywu 4–40x)

Środek do zatapiania, taki jak Dako Faramount (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel (nr kat. C0563)

Tkanki o dodatnim i ujemnym odczynie, do stosowania w charakterze próby kontrolnej (zobacz część Kontrola jakości)

Szkiełka: SuperFrost Plus, powlekane poli-L-lizyną lub Dako Silanized Slides (nr kat. S3003)

Ksylen, toluen lub substytuty ksylenu

Test SK001 został zoptymalizowany do użycia z automatyzowanym systemem Dako Link. Więcej informacji przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

#### Środki ostrożności - żołądek

- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Odczynnik jest przeznaczony dla przeszkolonych Użytkowników.
- Opisywany produkt zawiera silnie toksyczny związek — azyd sodu (NaN<sub>3</sub>), w czystej postaci. Stężenie NaN<sub>3</sub> występujące w produkcie nie jest klasyfikowane jako niebezpieczne. Jednak w wyniku reakcji NaN<sub>3</sub> z ołowiem lub miedzią, wchodzącymi w skład instalacji kanalizacyjnych, mogą powstawać silnie wybuchowe azydki metali. Przy usuwaniu resztek odczynnika używać dużych ilości wody do przepłukiwania, aby uniknąć gromadzenia się azydów w instalacji kanalizacyjnej (21).
- Odczynnik blokujący peroksydazę wchodzący w skład zestawu HercepTest™ zawiera nadtlenek wodoru w stężeniu 3%. Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie.
- Wchodzące w skład testu HercepTest™ przeciwciała królicze przeciwko ludzkiemu białku HER2, odczynnik HercepTest™ Visualization Reagent oraz odczynnik do kontroli ujemnej testu HercepTest™ zawierają materiał pochodzenia zwierzęcego.
- Podobnie jak w przypadku każdego produktu otrzymywanego z materiału biologicznego, należy stosować odpowiednie procedury postępowania.
- Preparaty kontrolne i próbki (przed i po utrwaleniu) oraz wszystkie przyrządy i materiały mające z nimi kontakt, powinny być traktowane jako mogące przenosić zakażenia i likwidowane z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności (22). Nigdy nie pipetować odczynników ustami i unikać narażania skóry i błon śluzowych na kontakt z odczynnikami i próbkami. W razie kontaktu odczynników z wrażliwymi okolicami skóry należy je spłukać obfitą ilością wody.

8. Unikać zanieczyszczeń mikrobiologicznych odczynnika. W przeciwnym razie może dojść do nasilenia nieswoistego barwienia.
9. Stosowanie innych od opisanych parametrów czasów inkubacji, temperatur lub metod może powodować błędne wyniki badania. Nadmierne suszenie w temperaturze  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  przez ponad jedną godzinę może spowodować znaczny zanik lub brak immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym (17).
10. Dostarczone odczynniki mają optymalne rozcieńczenia. Zwiększanie rozcieńczenia może powodować utratę odczynu antygenów.
11. Wszystkie odczynniki zostały przygotowane specjalnie do użycia z tym testem. In order for the test to perform as specified, no substitutions should be made.
12. Działanie silnego światła może negatywnie wpłynąć na odczynnik HercepTest™ Visualization Reagent oraz na chromogen DAB testu HercepTest™. Nie należy przechowywać składników systemu ani wykonywać barwienia w silnym oświetleniu, takim jak bezpośrednie światło słoneczne.
13. Do precyzyjnej interpretacji metodą HercepTest™ barwienia próbek gruczolakoraka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, pochodzących z biopsji, zaleca się skupisko co najmniej 5 wybarwionych komórek guza. Skupisko przynajmniej 5 wybarwionych komórek guza składa się z 5 połączonych, wybarwionych komórek guza.
14. Ze względu na heterogenną naturę preparatów biopsyjnych raka żołądka ważne jest, aby przeprowadzić badanie HER2 IHC na wielu skrawkach (7-8) materiału z różnych obszarów guza dla uzyskania wiarygodnych wyników.
15. Zaleca się zbadanie więcej niż jednego bloku tkankowego wycinków raka żołądka w przypadku, gdy próbka wykazuje wysoki poziom heterogenności (40).
16. Należy stosować właściwe wyposażenie ochronne, zabezpieczające przed kontaktem odczynnika ze skórą bądź oczami.
17. Niewykorzystany odczynnik należy usuwać zgodnie ze stosownymi przepisami lokalnymi i krajowymi.
18. Użycie objętości odczynnika innych niż zalecane może doprowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności HER2. Skrawki tkanek większe od 22 mm x 22 mm będą wymagać naniesienia 2–3 x 200  $\mu\text{L}$  odczynnika w 2–3 obszarach automatycznej aplikacji.
19. Chromogen DAB wchodzący w skład zestawu HercepTest™ zawiera  $\geq 75$ – $\leq 90\%$  propano-1,2-diolu,  $\leq 10\%$  roztworu tetrachlorowodoru 3,3'-diaminobenzydyny (tetrachlorek bifenylo-3,3',4,4'-tetra-yltetraamonowy) i jest oznaczony jako:



### Niebezpieczeństwo

- |             |   |
|-------------|---|
| H350        | Może powodować raka.  |
| H341        | Podjeżdza się, że powoduje wady genetyczne.   |
| P201        | Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.   |
| P280        | Stosować rękawice ochronne. Nosić okulary ochronne lub ochronę twarzy. Stosować odzież ochronną.                              |
| P308 + P313 | W PRZYPADKU narażenia lub styczości: Zwrócić się o pomoc lekarską.  |
| P405        | Przechowywać pod zamknięciem.   |
| P501        | Zawartość pojemnika jak i pojemnik utylizować zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, narodowymi oraz międzynarodowymi przepisami. |
20. Bufor HercepTest™ DAB Substrate Buffer zawiera < 1% imidazolu i jest oznaczony następująco:



### Niebezpieczeństwo

- |             |   |
|-------------|---|
| H360        | 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 styczości: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.                   |
| P405        | Przechowywać pod zamknięciem.   |
| P501        | Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami. |
21. Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.

Za ogólną regułą należy przyjąć, że osoby poniżej 18 lat nie mogą pracować z tym produktem. Należy poinformować użytkowników testu o prawidłowej procedurze pracy, niebezpiecznych własnościach produktu oraz o niezbędnych instrukcjach BHP (zgodnie z Dyrektywą Europejską 94/33/WE). Dodatkowe informacje znajdują się w Karcie Charakterystyki Bezpieczeństwa Materiału (SDS).

USA: 3,3'-diaminobenzydyna (DAB) może być szkodliwa po przedostaniu się do dróg oddechowych, w kontakcie ze skórą i w razie połknięcia. Substancja działa drażniąco na oczy i skórę. Jeśli doszło do kontaktu ze skórą, należy opłukać miejsca kontaktu wodą z mydłem.

**UWAGA:** Mimo że pod względem struktury diaminobenzydyna jest pokrewna benzydynie, nie ma dowodów na rakotwórcze działanie diaminobenzydyny. Należy przestrzegać lokalnych, stanowych lub federalnych przepisów dotyczących likwidacji.

### Przechowywanie - żołądek

Podczas przerwy w używaniu w zautomatyzowanych systemach Dako Link przechowywać w temperaturze 2–8°C. Odczynniki HercepTest™ Peroxidase-Blocking Reagent, HercepTest™ Visualization Reagent, bufor HercepTest™ DAB Substrate Buffer i chromogen HercepTest™ DAB Chromogen należy przechowywać w ciemnym miejscu, w temperaturze 2–8°C.

Nie należy używać zestawu po upływie terminu ważności podanego na opakowaniu zewnętrznym. Jeżeli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane na wkładce informacyjnej do opakowania, Użytkownik powinien sprawdzić ich jakość (14a, 14b). Należy zwrócić uwagę, że również preparaty do kontroli jakości powinny być przechowywane w temperaturze 2–8°C.

Nie ma jednoznacznych oznak świadczących o niestabilności tego produktu. Dlatego równoległe z odczynnikami na materiale pochodzącym od pacjentów należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne. W wypadku nieoczekiwanego wyniku odczynu, którego nie można wyjaśnić różnicami w procedurach laboratoryjnych, gdy podejrzewa się problem z testem HercepTest™, należy niezwłocznie skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy Dako.

## Przygotowanie próbek - żołądek

Próbki gruczolakoraka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, pochodzące z biopsji, wycinki lub resekcji należy poddać obróbce, aby utwalić tkanki do barwienia immunocytochemicznego. Do wszystkich preparatów należy stosować standardowe metody przeprowadzania tkanek (15). W przypadku badania małych preparatów biopsyjnych należy upewnić się, czy do oceny IHC zachowano morfologię guza i obecność wystarczającej liczby komórek guza. Przy analizie HercepTest™ preparatów biopsyjnych, do uzyskania wiarygodnych danych na temat statusu HER2 wyniku należy przeanalizować kilka (7-8) preparatów nadających się do analizy, pobranych z różnych regionów guza.

### *Skrawki zatapiane w parafinie*

Do użytku nadają się tkanki utralone w obojętnie buforowanej formalinie i zatopione w parafinie. Próbki należy np. przygotować w formie bloczków o grubości od 3 do 4 mm i utrwalać przez 18–24 godziny w obojętnie zbuforowanej formalinie. Preparaty biopsyjne utrwalało przez 6-8 godzin w badaniu ToGA (opis badania w punkcie (36)). Następnie tkanki poddaje się odwodnieniu, stosując serię kąpeli etanolowych i ksylenowych o stopniowo zmieniającym się stężeniu, po czym przepaja płynną parafiną w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Prawdopodobnie utralone i zatopione tkanki wykazujące ekspresję białka HER2 mogą być przed pocięciem na skrawki i zatopieniem na szkiełkach przechowywane w chłodnym miejscu (15–25°C) przez dowolnie długi czas (15,16). W Stanach Zjednoczonych dokument Clinical Laboratory Improvement Act of 1988 (Zmiany w zasadach postępowania w laboratoriach klinicznych, 42 CFR 493.1259(b)) „nakłada na użytkowników wymóg przechowywania wybarwionych szkiełek przez co najmniej 10 lat od daty badania i zachowania bloczków próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania” (16).

Preparaty tkankowe należy pociąć na skrawki o wymiarach 4–5 µm, zatopić w szkiełkach i suszyć na powietrzu w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin (lub do wysuszenia) albo w temperaturze 37°C przez całą noc lub w temperaturze 60°C w ciągu jednej godziny. **PRZESTROGA:** Nadmierne ogrzewanie przez ponad jedną godzinę w temperaturze ≥60°C może spowodować znaczny zanik lub brak immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym (17).

Aby zachować antygenowość, skrawki tkankowe zatopione na szkiełkach (SuperFrost Plus, Poly-L-lysine lub szkiełka silanizowane) powinny zostać poddane barwieniu w ciągu 4–6 tygodni od sporządzenia skrawków, o ile skrawki były przechowywane w temperaturze pokojowej (20–25°C) (18). Preparaty służące do oceny ekspresji białka HER2 i weryfikacji obecności nowotworu należy przygotowywać w tym samym czasie. Zaleca się stosowanie co najmniej 5 szkiełek — 1 do badania obecności nowotworu, 2 do oceny ekspresji białka HER2 (1 szkiełko do inkubacji z przeciwciałami króliczymi przeciwko ludzkiemu białku HER2 i 1 do inkubacji z odczynnikiem Negative Control Reagent) oraz 2 szkiełek zapasowych. Aby zachować antygenowość, skrawki tkankowe zatopione na szkiełkach (SuperFrost Plus, Poly-L-lysine lub szkiełka silanizowane) powinny zostać poddane barwieniu w ciągu 4-6 tygodni od sporządzenia skrawków, o ile skrawki były przechowywane w temperaturze pokojowej (20–25°C) (18).

Z uwagi na brak odpowiednich badań, nie zaleca się stosowania testu HercepTest™ w odwapnionych tkankach.

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowywania próbek przedstawiono w podręczniku Dako „Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods” (19), a także odsyłacze 15 i 16.

### *Przygotowanie tkanek do wykonania odczynu*

W celu zapewnienia optymalnego działania testu należy zastosować konkretną metodę odmaskowania antygeny w buforze cytrynianowym o stężeniu 0,01 mol/L. Roztwór do odmaskowania antygeny wchodzi w skład zestawu HercepTest™. Metoda ta polega na ogrzaniu skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach zanurzonych w buforze cytrynianowym o stężeniu 0,01 mol/L (20) w kalibrowanej łaźni wodnej lub zbiorniku Dako PT Link (Wydanie PT101 i PT200) w wymaganej temperaturze (95–99°C). Laboratoria znajdujące się w miejscach położonych wysoko nad poziomem morza powinny określić najlepszą metodą utrzymywania wymaganej temperatury. Przetestowano inne metody odmaskowania antygeny, jednak nie dawały one powtarzalnych wyników. Odstępstwa od opisywanej procedury mogą mieć wpływ na wyniki.

## Przygotowanie odczynników - żołądek

Dla wygody zaleca się przygotowanie następujących odczynników przed rozpoczęciem barwienia:

### *Epitope Retrieval Solution*

Dla planowanej procedury barwienia rozcieńczyć odpowiednią ilość roztworu Epitope Retrieval Solution w stosunku 1:10, używając wody destylowanej lub dejonizowanej. Niewykorzystany rozcieńczony roztwór może być używany przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej lub przechowywany w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. W przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

### *Bufor płuczący*

Rozcieńczyć odpowiednią ilość roztworu Dako Wash Buffer (nr kat. S3006) w stosunku 1:10 w wodzie destylowanej lub dejonizowanej. Niewykorzystany rozcieńczony bufor może być używany przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej lub przechowywany w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. W przypadku zmętnienia bufor nie nadaje się do użycia. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

### *Roztwór substrat-chromogen (DAB)*

W butelkach na odczynniki napełnianych przez użytkownika przygotować roztwór Substrate-Chromogen Solution, dodając 25 µL chromogenu DAB na 1 mL odczynnika DAB Substrate Buffer, i wymieszać. Gotowy roztwór Substrate-Chromogen Solution (DAB) zachowuje trwałość przez około 5 dni, gdy jest przechowywany w temperaturze 2–8°C. Przed użyciem roztwór należy wymieszać. Wytrącanie się osadu nie wpływa na jakość odczynu.

Przed użyciem butelki na odczynnik napełniane przez użytkownika z roztworem Substrate-Chromogen Solution należy zdefiniować w zautomatyzowanych systemach Dako Link. Dalsze informacje przedstawiono w instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

**UWAGA:** Barwa roztworu DAB Chromogen może przyjmować odcienie od przejrzystego do jasnofioletowobrazowego. Barwa roztworu nie wpływa na wydajność produktu. Proszę rozcieńczać zgodnie z wytycznymi zawartymi w niniejszej ulotce dołączanej do opakowania. Dodanie nadmiernej ilości roztworu DAB Chromogen do buforu DAB Buffered Substrate spowoduje pogorszenie jakości odczynu dodatniego.

#### *Barwienie kontrastowe*

Barwny produkt końcowy reakcji barwienia chromogenem DAB jest nierozpuszczalny w alkoholu i wodzie. W charakterze barwnika kontrastowego można wykorzystać odczynnik Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308). Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link. Nie jest wymagane przygotowanie żadnych odczynników.

#### *Środek do zatapiania*

Zaleca się stosowanie bezwodnego, trwałego środka do zatapiania. Dopuszczalne jest jednak również zatapianie wodne. W przypadku zatapiania wodnego zaleca się stosowanie środka Dako Faramount Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel™ Mounting Medium (nr kat. C0563). Przed użyciem należy przeprowadzić preparat Glycergel w stan ciekły, ogrzewając do temperatury ok. 40 (±5)°C.

## Wykonanie odczynu - żołądek

#### *Uwagi dotyczące procedury*

Przed przystąpieniem do wykonania odczynu Użytkownik powinien uważnie przeczytać podane instrukcje i zaznajomić się ze wszystkimi składnikami i oprzyrządowaniem (zobacz część Środki ostrożności).

Podczas wykonywania barwienia nie można dopuścić do wysychania skrawków tkankowych. Wyszuszone skrawki tkankowe mogą powodować nasilenie nieswoistego odczynu.

Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link. Informacje dotyczące wkładania szkiełek mikroskopowych i odczynników oraz programowania przedstawiono w Instrukcji użytkownika zautomatyzowanych systemów Dako Link.

Jeśli procedura wykonywania odczynu zostanie przerwana, preparaty można przechowywać w roztworze buforu, który tworzy się po inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi, przez maksymalnie jedną godzinę w temperaturze pokojowej (20–25°C) bez wpływu na wyniki odczynu.

#### *Odparafinowanie i ponowne uwodnienie*

Przed przystąpieniem do wykonania odczynu należy odparafinować preparaty w celu usunięcia środka zatapiającego i ponownego uwodnienia. Należy unikać niecałkowitego usunięcia parafiny. Pozostałości środka zatapiającego powodują nasilenie odczynu nieswoistego. Ten etap powinien być wykonywany w temperaturze pokojowej (20–25°C).

1. Umieścić preparaty w kąpeli ksylenowej i inkubować przez 5 (±1) minut. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
2. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w absolutnym etanolu na 3 (±1) minuty. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
3. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w roztworze etanolu o stężeniu 95% na 3 (±1) minuty. Zmienić kąpiel i jednokrotnie powtórzyć procedurę.
4. Strząsnąć nadmiar płynu i umieścić preparaty w destylowanej lub dejonizowanej wodzie na minimum 30 sekund. Rozpocząć wykonywanie odczynu zgodnie z opisem w części o wykonaniu odczynu zgodnie z obowiązującą procedurą odmaskowania antygenu.

Po wykonaniu barwienia 40 preparatów należy zmienić roztwór ksylenu i alkoholu. Można stosować ksylen lub substytuty ksylenu, takie jak preparat HistoClear.

**UWAGA:** Odczynniki i instrukcje dostarczane w zestawie opracowano w celu uzyskania optymalnych wyników. Dodatkowe rozcieńczenie odczynników bądź nieprzestrzeganie czasu lub temperatury inkubacji może spowodować uzyskanie błędnych lub sprzecznych wyników. Różnice w metodach przetwarzania tkanek oraz procedurach technicznych stosowanych w laboratorium użytkownika mogą spowodować, że wyniki testu nie będą ważną podstawą wyboru pacjentów do terapii lekiem Herceptin™.

#### *Wykonanie odczynu*

Protokół barwienia i czasy inkubacji są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu zautomatyzowanego systemu Dako Link. Po odparafinowaniu, ponownym uwodnieniu i odmaskowaniu antygenu aparat przetworzy preparaty zgodnie z protokołem opisanym poniżej.

#### **Etap 1: Odmaskowanie antygenu**

Napełnić zbiorniki Dako PT Module lub naczynie do barwienia (np. naczynie Coplina) roztworem Epitope Retrieval Solution (zob. opis przygotowania odczynników).

W przypadku zbiornika Dako PT Link (Wydanie PT101 i PT200): Wstępnie ogrzać rozcieńczony roztwór Epitope Retrieval Solution w zbiorniku Dako PT Link do temperatury 85°C. Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie. Włożyć odparafinowane skrawki doprowadzone do temperatury pokojowej do statywu aparatu Autostainer Racks i zanurzyć szkiełka we wstępnie ogrzanym roztworze Epitope Retrieval Solution. Począć, aż zbiornik Dako PT Link rozgrzeje się do 97°C i inkubować przez 40 (±1) minut w temperaturze 97°C. Pozostawić skrawki w zbiorniku Dako PT Link do chwili, gdy ostygną do temperatury 85°C. Wyjąć zbiorniki PT Link ze skrawkami z urządzenia Dako PT Link. Pozostawić zbiorniki na stole na ok. 10 minut z otwartą pokrywą w celu dalszego schładzania. Przepłukać skrawki buforem Wash Buffer. Dodatkowe informacje można znaleźć w instrukcji użytkownika systemu Dako PT Link.

W przypadku naczyń Coplina: Umieścić naczynia do barwienia z rozcieńczonym roztworem Epitope Retrieval Solution w łaźni wodnej. **Doprowadzić łaźnię wodną z roztworem Epitope Retrieval Solution do temperatury 95–99°C.** Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie. Osłonić naczynia pokrywkami w celu ustabilizowania temperatury i eliminacji parowania. Zanurzyć odparafinowane skrawki o temperaturze pokojowej w podgrzanym roztworze Epitope Retrieval Solution znajdującym się w naczyniach do barwienia.

**Ponownie podnieść temperaturę łaźni wodnej z roztworem Epitope Retrieval Solution do 95–99°C.** Inkubować przez 40 (±1) minut w temperaturze 95–99°C. Wyjąć naczynie zawierające preparaty z łaźni wodnej. Odczekać 20 (±1) minut w temperaturze pokojowej, aż nastąpi schłodzenie preparatów w roztworze Epitope Retrieval Solution. Zlać roztwór Epitope Retrieval Solution i opłukać skrawki buforem Wash Buffer.

Aby zapewnić optymalną wydajność, po zakończeniu odmaskowania epitopu, a przed rozpoczęciem barwienia, należy zanurzyć skrawki w buforze Wash Buffer na 5–20 minut.

**UWAGA:** Roztwór Epitope Retrieval Solution jest przeznaczony do jednokrotnego stosowania. Nie używać ponownie.

## Etap 2: Wykonanie odczynu

Po odmaskowaniu antygeny szkiełka zostaną wyjęte z koszyków aparatu i umieszczone w systemach zautomatyzowanych Dako Link. Aparat wykona odczyn, stosując odpowiedni odczynnik, monitorując czas inkubacji i przepłukując szkiełka między kolejnymi odczynnikami. Czasy inkubacji z poszczególnymi odczynnikami są wstępnie zakodowane w oprogramowaniu systemu Dako Link.

## Etap 3: Barwienie kontrastowe

Szkiełka można barwić kontrastowo odczynnikiem Hematoxylin for Automated Link Platforms (nr kat. SK308). W oprogramowaniu systemu Dako dostępne są 2 protokoły barwienia. W jednym z nich uwzględnione jest barwienie kontrastowe hematoksyliną, a w drugim nie. Czas inkubacji z hematoksyliną jest wstępnie zaprogramowany w protokole uwzględniającym barwienie kontrastowe. Informacje dotyczące programowania protokołów przedstawiono w instrukcji użytkownika systemów Dako Link.

## Etap 4: Zatapianie preparatu

Zaleca się stosowanie bezwodnego, trwałego środka do zatapiania. Dopuszczalne jest jednak również zatapianie wodne. Do zatopienia i nakrycia preparatów można użyć środka wodnego, takiego jak Dako Faramount (nr kat. S3025) lub Dako Glycergel™ (nr kat. C0563).

**UWAGA:** Odczyt odczynu można przeprowadzić w dogodnym dla użytkownika momencie. Jednak, jeżeli do nakrywania zastosowano wodny środek do zatapiania, ekspozycja na silne światło przez okres jednego tygodnia może powodować zblaknięcie. Aby ograniczyć zblaknięcie, należy przechowywać preparaty w zaciemnionym miejscu, w temperaturze pokojowej (20–25°C).

## Kontrola jakości - żołądek

Stosowanie w laboratorium Użytkownika innych metod utrwalania, przeprowadzania i zatapiania tkanek może spowodować istotne różnice wyników, wymagające regularnego wykonywania dodatkowej wewnętrznej kontroli jakości, niezależnie od standardowych załączonych preparatów kontroli jakości Dako. Użytkownicy w Stanach Zjednoczonych powinni zapoznać się z wytycznymi przeprowadzania kontroli jakości zawartymi w dokumencie College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry, CLSI (dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (23), a także z pozycją literaturową 24, która zawiera dodatkowe informacje.

**Tabela 8: Cel codziennej kontroli jakości.**

<i>Rodzaj tkanki: utrwalona i poddana obróbce identycznie jak próbki pochodzące od pacjenta</i>	<i>Swoiste przeciwciała i system detekcji</i>	<i>Nieswoiste przeciwciała* lub bufor plus ten sam system detekcji, co używany z przeciwciałami swoistymi</i>
Kontrola dodatnia: Tkanki lub komórki zawierające antygen docelowy (mogą występować w tkankach pacjenta). Idealna próba kontrolna jest tkanką wykazującą słabo dodatni odczyn i możliwie największą czułość na utratę właściwości przez przeciwciała lub antygeny.	Kontrola wszystkich etapów badania. Weryfikacja odczynnika i procedur stosowanych do odczynu białka HER2.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Kontrola ujemna: Tkanki lub komórki z oczekiwanym ujemnym wynikiem odczynu (mogą występować w tkankach pacjenta lub dodatniej kontroli tkankowej).	Detekcja niepożądanego reakcji krzyżowej przeciwciał z komórkami lub strukturami komórkowymi.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Tkanka pochodząca od pacjenta.	Detekcja odczynu swoistego.	Detekcja nieswoistego odczynu tła.
Preparat kontrolny dostarczony przez Dako.	Wyłącznie odczyn z preparatami kontrolnymi.	

\* Surowica od tego samego gatunku i izotypu, co w przypadku przeciwciała pierwotnego, ale nie skierowana przeciwko temu samemu antygenowi. Do wykrywania nieswoistego wiązania przeciwciał, tzn. wiązania fragmentu Fc przeciwciała przez tkankę.

### Preparat kontrolny (w zestawie)

Każdy z dostarczonych preparatów kontrolnych zawiera trzy odwirowane, utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie ludzkie linie komórkowe raka sutka, dające odczyn o nasileniu 0, 1+ i 3+. W każdej serii należy wykonać odczyn tylko na jednym preparacie kontrolnym. Ocena linii komórkowych preparatów kontrolnych dostarczonych przez Dako pozwala ustalić ważność serii odczynów.

### Tkanka do dodatniej próby kontrolnej

Preparaty kontrolne należy sporządzić ze świeżych materiałów sekcyjnych, biopsyjnych lub chirurgicznych, możliwie szybko utrwalonych i zatopionych w sposób analogiczny do próbki (próbek) pochodzących od pacjenta.

Wynik dodatniej kontroli potwierdza właściwe przygotowanie tkanek i prawidłową technikę barwienia. Dla wszystkich serii odczynów i dla każdego rodzaju warunków badania należy uwzględnić jedną dodatnią kontrolę tkankową.

Tkanki stosowane jako dodatnie próby kontrolne powinny dawać słaby odczyn dodatni, pozwalający na wykrywanie niewielkich zmian czułości przeciwciał pierwotnych. Preparaty kontrolne dostarczane z opisywanym zestawem lub preparaty poddane obróbce w sposób odmienny od próbek pochodzących od pacjenta pozwalają wyłącznie na weryfikację działania odczynników; preparaty kontrolne nie nadają się do weryfikacji prawidłowego przygotowania tkanek. Dla najlepszej dodatniej kontroli tkankowej należy zastosować tkankę z uprzednio oznaczoną nadekspresją gruczolakoraka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, z obecnością białka 2+ HER2.

**UWAGA:** Znane dodatnie kontrole tkankowe powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania jakości badanych tkanek i odczynników testowych, a NIE pomocniczo do formułowania swoistych rozpoznań próbek pochodzących od pacjentów.

Jeżeli nie udaje się potwierdzić dodatniego odczynu w preparatach dodatnich kontroli tkankowych należy uznać, że wyniki preparatów pochodzących od pacjentów są nieważne.

#### *Tkanka do ujemnej próby kontrolnej*

Należy stosować ujemną kontrolę za pomocą tkanki dającej odczyn ujemny, w której nie występują białka HER2. Dla każdej serii odczynów tkanka powinna zostać utrwalona, przeprowadzona i poddana zatapaniu w sposób identyczny do próbki (próbek) pochodzącej od pacjenta, w celu weryfikacji swoistości przeciwciał pierwotnych i identyfikacji swoistego odczynu tła. Tkankami odpowiednimi do ujemnej próby kontrolnej są tkanki okrężnicy, wątroby lub tarczycy. W charakterze wewnętrznej kontroli ujemnej można wykorzystywać różne rodzaje komórek pochodzące z większości tkanek. Preparaty do kontroli ujemnej powinny zostać zweryfikowane przez Użytkownika.

Jeżeli w badaniu tkanek stanowiących ujemną próbę kontrolną uzyskuje się swoisty odczyn, wyniki uzyskane dla próbki pochodzącej od pacjenta należy uznać za nieważne, a test należy powtórzyć.

Dodatkowe informacje dotyczące przetwarzania preparatów kontrolnych przedstawiono w instrukcji użytkownika systemów Dako Link.

#### *Nieswoisty odczynnik do kontroli ujemnej*

W celu oceny występowania odczynu nieswoistego i ułatwienia interpretacji swoistego odczynu w miejscach występowania antygenów, dla każdego wycinka pochodzącego od pacjenta, w miejsce przeciwciał pierwotnych należy stosować odczynnik do kontroli ujemnej. Czas inkubacji odczynnika Negative Control Reagent powinien odpowiadać czasowi stosowanemu w przypadku przeciwciał pierwotnych.

#### *Weryfikacja odczynu*

Przed pierwszym zastosowaniem systemu do wykonywania odczynów Użytkownik powinien zweryfikować jakość barwienia. W tym celu należy wykonać testy serii wewnętrznych tkanek kontrolnych o znanej charakterystyce odczynów w zakresie IHC, odpowiadających tkankom o dodatnim i ujemnym odczynie. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości omówionymi wcześniej w tej sekcji ulotki oraz z wymaganiami określonymi w dokumentach CAP Certification Program for Immunohistochemistry oraz CLSI (dawniej NCCLS) Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (23). Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać z każdą nową partią przeciwciał i za każdym razem, gdy wystąpi zmiana w parametrach odczynu. Do weryfikacji testu odpowiednie są tkanki gruczolakoraka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego, o znanej intensywności barwienia białka HER2 od 0 - 3+ oraz tkanki ujemne, np. z okrężnicy, wątroby lub tarczycy.

## Interpretacja odczynu - żołądek

Wykrywanie nadmiernej ekspresji białka HER2 powinno odbywać się wyłącznie w oparciu o nasilenie odczynu błonowego, który należy oceniać na podstawie skali przedstawionej w Tabeli 9. Oceny preparatów powinien dokonywać patolog, posługując się mikroskopem świetlnym. W celu oceny obecności i nasilenia odczynu immunohistochemicznego należy stosować obiektyw o powiększeniu 10x. Zastosowanie obiektywu o powiększeniu 5–40x jest korzystne dla potwierdzenia wyniku. Odczyn cytoplazmatyczny należy uznać za nieswoisty i nie należy go brać pod uwagę przy ocenie nasilenia odczynu błonowego (8). W rozróżnianiu poziomów nasilenia 0, 1+, 2+ i 3+ pomocny jest wydany przez firmę Dako atlas „HercepTest™ Interpretation Manual – Gastric Cancer” (Atlas interpretacji odczynów HercepTest™ - żołądek), który zawiera reprezentatywne obrazy odczynów o różnej intensywności.

Ocenić należy wyłącznie próbki pochodzące od chorych, u których występuje gruczolakorak żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przełykowego. W przypadku metaplazji nabłonka żołądka w nabłonek jelitowy i gruczolakoraka żołądka w tym samym preparacie należy oceniać tylko składnik gruczolakoraka żołądka. W przypadku interpretacji barwienia preparatów biopsyjnych metodą HercepTest™ zaleca się skupisko co najmniej 5 wybarwionych komórek guza. Skupisko przynajmniej 5 wybarwionych komórek guza składa się z 5 połączonych, wybarwionych komórek guza.

**Tabela 9. Interpretacja i ocena znakowania immunohistochemicznego HER2**

Wynik	Preparat chirurgiczny – Wzór barwienia	Preparat biopsyjny – Wzór barwienia	Ocena nadmiernej ekspresji HER2
0	Brak reaktywności lub brak reaktywności błonowej w < 10% komórek guza	Brak reaktywności lub brak reaktywności błonowej (lub w skupisku < 5 komórek) w żadnej komórce guza	Ujemny
1+	Błada, ledwo rozpoznawalna reaktywność błonowa w ≥ 10% komórek guza; reaktywne są tylko fragmenty błon poszczególnych komórek	Skupisko komórek (≥ 5 komórek) guza z bładą, ledwo rozpoznawalną reaktywnością błonową niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	Ujemny



2+	Słaba/umiarkowana reaktywność na całej powierzchni, na podstawno-bocznych lub bocznych brzegach błony w $\geq 10\%$ komórek guza	Słaba/umiarkowana reaktywność na całej powierzchni, na podstawno-bocznych lub bocznych brzegach błon skupiska ( $\geq 5$ komórek) komórek guza niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	Niejednoznaczny
3+	Silna reaktywność na całej powierzchni, na podstawno-bocznych lub bocznych brzegach błony w $\geq 10\%$ komórek guza	Silna reaktywność na całej powierzchni, na podstawno-bocznych lub bocznych brzegach błon skupiska ( $\geq 5$ komórek) komórek guza niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza	Dodatni

Wskazówki wg Hofmann et al. (39).

Wynik testu HercepTest™ w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2 interpretuje się jako ujemny (odczyn o intensywności 0 i 1+), niejednoznaczny (2+) albo dodatni (3+). Pacjenci ani lekarze nie powinni wykorzystywać wyników testu HercepTest™ jako podstawy do prognoz; test HercepTest™ nie został zatwierdzony do takich zastosowań.

W każdej serii preparaty należy badać w kolejności podanej w Tabeli 10, co pozwoli na określenie ważności wyników z danej serii oraz ilościową ocenę nasilenia odczynu próbki tkankowej.

**Tabela 10: Kolejność oceny preparatów.**

<i>Kolejność odczytu preparatów</i>	<i>Uzasadnienie</i>
1. Preparat kontrolny zawierający trzy linie komórkowe.  Preparat kontrolny zawierający trzy linie komórkowe.	Obecność brązowego odczynu błonowego (na obwodzie) o nasileniu 3+ w kontrolnej linii komórkowej 3+ SK-BR-3, brązowego odczynu na części obwodu w kontrolnej linii komórkowej 1+ MDA-175 oraz brak odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 świadczy o prawidłowym przebiegu testu.  W niewielkiej lub umiarkowanej liczbie komórek linii kontrolnej 1+ MDA-175 występuje błonowy odczyn punktowy i nieciągły. W tej linii komórkowej odczyn punktowy można również zaobserwować w cytoplazmie, w rejonie aparatu Golgiego.  Obecność brązowego odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 (ujemnej w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2) wskazuje na wystąpienie nieswoistego odczynu. Wyniki mogą być w takim wypadku nieważne.
2. Preparat z tkanki do dodatniej próby kontrolnej.	Powinien być widoczny brązowy odczyn błonowy. W cytoplazmie i tkankach ujemnych nie powinien występować odczyn silniejszy niż 1+.
3. Preparat tkankowy do ujemnej próby kontrolnej.	<b>BRAK</b> odczynu swoistego w preparacie tkankowym do kontroli ujemnej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórek. Jeżeli w badaniu preparatów tkankowych stanowiących ujemną próbę kontrolną uzyskuje się swoisty odczyn błonowy, wyniki uzyskane dla próbek pochodzących od pacjenta należy uznać za nieważne.
4. Preparat z tkanki pochodzącej od pacjenta poddany działaniu odczynnika do kontroli ujemnej.	Brak swoistego odczynu błonowego potwierdza swoistość znakowania wykrywanego antygenu przez przeciwciała pierwotne.  Inny odczyn jasnobrązowy lub brązowy występujący w cytoplazmie próbki poddanej działaniu odczynnika do kontroli ujemnej, np. w komórkach tkanki łącznej, leukocytach, erytrocytach lub komórkach martwiczych, należy uznać za nieswoisty odczyn tła i zgłosić w rubryce komentarzy na arkuszu danych.
5. Preparat z tkanki pochodzącej od pacjenta poddany działaniu przeciwciała pierwotnego.	Nadmierna ekspresja białka HER2 w próbce objawi się jako brązowe obrzeże na błonie komórek nowotworu, na które zadziało przeciwciałem pierwotnym.

**1. Preparat kontrolny (w zestawie):** W pierwszej kolejności należy zbadać preparat kontrolny przebadany testem HercepTest™, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Obecność brązowego produktu reakcji (3,3'-diaminobenzyny, DAB) na błonach komórkowych świadczy o reaktywności dodatniej.

Obecność brązowego odczynu błonowego (na obwodzie) w kontrolnej linii komórkowej 3+ SK-BR-3, brązowego odczynu na części obwodu w kontrolnej linii komórkowej 1+ MDA-175 oraz brak odczynu w kontrolnej linii komórkowej 0 MDA-231 świadczy o prawidłowym przebiegu testu. Jeśli którakolwiek z kontrolnych linii komórkowych nie spełnia powyższych kryteriów, wszystkie wyniki uzyskane z próbek pochodzących od pacjentów należy uznać za nieważne.

**2. Tkanka do dodatniej próby kontrolnej:** Następnie należy zbadać preparat dodatniej kontroli tkankowej. Ten preparat służy do potwierdzania skuteczności zastosowanej metody utrwalania i procesu odmaskowania antygenu. Do interpretacji należy wybierać jedynie komórki prawidłowe, gdyż w komórkach z martwicą lub uszkodzonych często występują odczyny nieswoiste (25). W komórkach nowotworu powinien występować brązowy odczyn błonowy. Nasilenie brązowego odczynu cytoplazmatycznego w tkankach ujemnych nie powinno przekraczać wartości 1+.

**3. Tkanka do ujemnej próby kontrolnej:** Tkanę do kontroli ujemnej należy zbadać po tkance do kontroli dodatniej, aby zweryfikować swoistość znakowania antygenu przez przeciwciała pierwotne. Brak odczynu swoistego w preparacie tkankowym do kontroli ujemnej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórek. Jeżeli w badaniu tkanek stanowiących ujemną próbę kontrolną uzyskuje się swoisty odczyn, wyniki uzyskane dla próbki pochodzącej od pacjenta należy uznać za nieważne. W charakterze tkanki do kontroli ujemnej można również wykorzystać ujemne fragmenty preparatu tkankowego do kontroli dodatniej, jednak w takim przypadku wymagana jest weryfikacja przeprowadzona przez użytkownika. Należy zauważyć, że w większości prawidłowych tkanek nabłonkowych może występować słaba reakcja (odczyn o nasileniu 0–1+). Do użycia w charakterze kontroli ujemnej nadają się np. tkanki: okrężnicy, wątroby i tarczycy.

Jeśli odczyn nieswoisty występuje, ma on charakter rozproszony (rozlany). W preparatach tkanek poddawanych nadmiernemu utrwalaniu w formalinie może niekiedy występować odczyn w obrębie tkanki łącznej.

**4 + 5. Tkanka pochodząca od pacjenta:** Na końcu należy zbadać próbki pochodzącej od pacjenta, poddane działaniu testu HercepTest™. Intensywność odczynu dodatniego należy oceniać w kontekście nieswoistego odczynu tła występującego w próbce z odczynnikiem kontroli ujemnej. Podobnie jak w każdym badaniu immunocytochemicznym, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, a nie że nie występował w badanych komórkach/tkankach. Konkretnie informacje na temat immunoreaktywności testu HercepTest™ można znaleźć w sekcji Streszczenie i wyjaśnienia, Ograniczenia oraz Charakterystyka wydajnościowa.

#### **Dodatkowe zalecenia dotyczące interpretacji odczynu w teście HercepTest™**

W testach gruczołakoraka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przetykowego badanych w kierunku nadekspresji białka HER2 uzyskuje się wynik od 0 do 3+. W przypadkach oceny 0 i 3+ wynik jest bardzo jednoznaczny, jednak niewielki odsetek próbek z wynikiem 1+ i 2+ może nastęrczać trudności interpretacyjnych. Poniżej wymieniono wskazówki dotyczące interpretacji odczynu w teście HercepTest™.

1. Ocenic kontrolne linie komórkowe w celu zweryfikowania działania testu.
2. Ocenic preparaty do kontroli dodatniej i ujemnej.
3. Przy pierwszej ocenie zaleca się wybarwienie preparatu tkankowego hematoksyliną i eozyną (H+E). (Charakter nowotworowy może nie być jednoznacznie widoczny w próbkach wybarwionych testem HercepTest™. Patolog, który ma zweryfikować obecność komórek nowotworowych, powinien otrzymać preparat wybarwiony H+E.) Test HercepTest™ należy wykonać na parze (serii) skrawków pochodzących z tego samego bloku parafinowego próbki.
4. Skrawki, na których wykonano odczyn w kierunku nadmiernej ekspresji białka HER2, należy najpierw badać w małym powiększeniu. Większość przypadków dodatnich będzie ewidentnie rozpoznawalna przy małym powiększeniu.
5. W przypadkach oceny 1+, w celu potwierdzenia odczynu błonowego należy użyć 40-krotnego powiększenia.
6. W przypadkach oceny 2+, w celu potwierdzenia odczynu błonowego należy użyć 10-20-krotnego powiększenia.

#### **Preparat chirurgiczny**

1. Do ustalania odsetka dodatnich komórek nowotworowych należy wykorzystać dobrze zachowane i dobrze wybarwione obszary próbki.
2. Jeśli w większości komórek nowotworu występuje odczyn na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach, to wynik wynosi 2+ lub 3+.
3. Jeśli w co najmniej 10% komórek nowotworu występuje silny odczyn na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach, to wynik wynosi 3+.
4. Jeśli w więcej niż 10% komórek nowotworowych występuje słaby lub umiarkowany odczyn na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach, to wynik dla próbki wynosi 2+.
5. Jeśli w więcej niż 10% komórek nowotworowych w preparatach chirurgicznych, wybarwione są tylko fragmenty błon poszczególnych komórek, mają bladą, ledwo rozpoznawalną intensywność, to wynik dla próbki wynosi 1+.
6. Jeśli w mniej niż 10% komórek nowotworowych próbki pooperacyjnej występuje odczyn, to niezależnie od wzoru barwienia (np. na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach), wynik dla próbki wynosi 0.
7. Jeśli nie obserwuje się barwienia, wynik dla próbki pooperacyjnej wynosi 0.

#### **Preparat biopsyjny**

1. Skupisko przynajmniej 5 wybarwionych komórek guza składa się z 5 połączonych, wybarwionych dla HER2 komórek guza.
2. Jeśli w skupisku co najmniej 5 komórkach nowotworu występuje silny odczyn na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach, to wynik wynosi 3+, niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza.
3. Jeśli w skupisku co najmniej 5 komórkach nowotworu występuje słaby lub umiarkowany odczyn na całej błonie komórkowej, na podstawno-bocznych lub bocznych jej brzegach, to wynik wynosi 2+, niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza.
4. Jeśli w skupisku co najmniej 5 komórkach nowotworu występuje odczyn o bladej, ledwo rozpoznawalnej intensywności i wybarwione są tylko fragmenty błon, to wynik wynosi 1+, niezależnie od odsetka wybarwionych komórek guza.
5. Jeśli nie obserwuje się barwienia, wynik dla próbki biopsyjnej wynosi 0.
6. Jeśli w mniej niż 5 komórkach nowotworowych występuje odczyn błonowy (niezależnie od intensywności), wynik dla próbki wynosi 0.

#### **Ograniczenia ogólne - żołądek**

1. Immunocytochemia jest wieloetapową metodą diagnostyczną wymagającą specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, wyborze tkanek, utrwalaniu i przeprowadzaniu, przygotowaniu preparatów do immunocytochemii i interpretacji wyników barwienia.
2. Wybarwienie tkanek jest uzależnione od obróbki i przetworzenia tkanki przed wykonaniem odczynu. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemiywanie, suszenie, ogrzewanie lub zanieczyszczenie skrawków domieszką innych tkanek lub płynów może powodować artefakty, ukrycie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Przyczyną sprzecznych wyników może być stosowanie zmiennych metod utrwalania i zatapiania lub właściwości zależne od tkanek.
3. Nadmierne lub niecałkowite barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.

4. Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być prowadzona w kontekście objawów klinicznych, morfologicznych i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna dodatniego lub ujemnego odczynu musi być uzupełniona przez badania morfologiczne, wykonywanie odpowiednich prób kontrolnych i innych badań diagnostycznych. Odpowiedzialność związana z interpretacją wybarwionego preparatu spoczywa na wykwalifikowanym histopatologu, dysponującym doświadczeniem obejmującym stosowane przeciwciała, odczynniki i metody. Barwienie należy wykonać w akredytowanej pracowni histopatologicznej, pod nadzorem histopatologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów i właściwe wykonanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych.
5. Tkanki pochodzące od osób z zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoiste barwienie w reakcji z peroksydazą chrzanową (26).
6. W typach tkanek, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji w przetestowanych tkankach z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworów i innych tkankach zmienionych chorobowo (27). W przypadku uzyskania nieoczekiwanych reakcji należy przesłać odpowiednią dokumentację do działu wsparcia technicznego firmy Dako.
7. Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Wyniki fałszywie dodatnie mogą również wystąpić na skutek aktywności podobnej do peroksydazy (erytrocyty) i endogennej aktywności peroksydazy (cytochromu C) (27).
8. Odczyn będzie wykonywany w zaprogramowanej temperaturze (20–25°C).

## Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu - żołądek

1. Antygen obecny w linii komórkowej 1+, MDA-175, z czasem ulega rozkładowi. Odczyn preparatu kontrolnego należy oceniać w kontekście daty ważności tego preparatu. Ujemny odczyn komórek MDA-175 może być jedynie objawem rozkładu preparatu. Preparaty kontrolne muszą być przechowywane w temperaturze 2–8°C.
2. Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygeny w tkankach. Jeżeli próbki przechowywano w temperaturze pokojowej (20–25°C), powinny być poddane barwieniu w ciągu 4–6 tygodni od zatopienia preparatów tkankowych na szkiełkach (28).
3. Nie wolno zastępować odczynników znajdujących się w zestawie odczynnikami posiadającymi inne numery partii lub odczynnikami innych producentów.
4. Ocena odczynu cytoplazmatycznego może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników. W interpretacji należy brać pod uwagę wyłącznie nasilenie odczynu błonowego.
5. Barwione preparaty kontrolne należy stosować wyłącznie w celu weryfikacji wyników serii odczynów, a *nie* w celu oceny odczynu w skrawkach tkankowych.
6. Możliwe jest sporadyczne występowanie silnego (3+) odczynu ogniskowego. Może to być efektem nierównomiernego utrwalenia i/lub przetwarzania tkanki. Zaleca się wykonanie odczynu drugiego bloczka tkanki z tej samej próbki.
7. Nie zweryfikowano użycia testu HercepTest™ do próbek utrwalanych w środkach innych niż obojętny roztwór buforowanej formaliny i płyn Bouina.
8. Uwaga: prawidłowy nabłonek migdałków i przełyku może dawać odczyn o intensywności dochodzącej do 2+.
9. Należy unikać stosowania zmiażdżonych próbek raka żołądka i interpretacji przypadkowego barwienia przy krawędzi preparatu biopsyjnego.

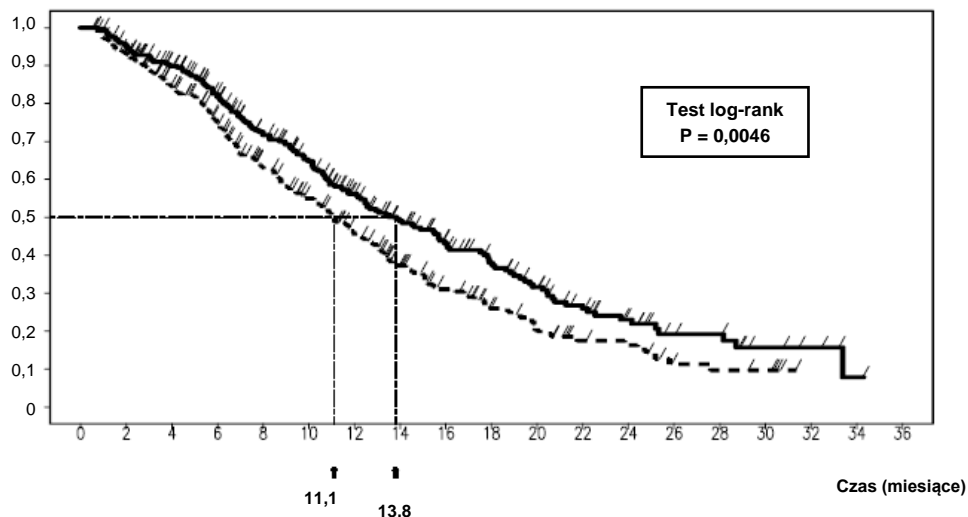
### Dodatkowe informacje

Bezpieczeństwo i skuteczność metody przy użyciu preparatu trastuzumab (Herceptin®) zostało wykazane w badaniach klinicznych (ToGA) (37, 38). Badanie zaprojektowano, jako otwarte, randomizowane, wieloośrodkowe badanie fazy III, obejmujące pacjentów HER2-dodatnich, z nieoperacyjnym, zaawansowanym miejscowo, nawracającym i/lub przerzutowym gruczolakorakiem żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego. Badanie ToGA dodatniego HER2 przeprowadzono na przykładzie metody IHC z pozytywną oceną (3+) (HercepTest™, Dako) i/lub dodatni wynik HER2 FISH (HER2/CEN17  $\geq$  2,0) (HER2 FISH pharmDx™ Kit, Dako). Wybrani losowo pacjenci byli poddawani chemioterapii (preparatem 5-FU lub capecytabine oraz cisplatin) lub chemioterapii razem z przyjmowaniem preparatu trastuzumab. Końcowym wynikiem badań był okres przeżycia (OS).

W ramach badania, randomizacji poddano 594 pacjentów a 584 pacjentów otrzymało badany lek i zostało ujętych w pełnym zestawie analiz (FAS). Wykazano, że statystyczne wyniki w przypadku połączenia chemioterapii z preparatem trastuzumab były lepsze względem wyników samej chemioterapii. Mediana OS wzrosła z 11,1 do 13,8 miesiąca ( $p=0,0046$ ) ze współczynnikiem ryzyka 0,74 (95 % CI: 0,60–0,91). Krzywą Kaplana-Meiera opisującą OS pokazano na Rysunku 1.

## Charakterystyka wydajnościowa - żołądek

Prawdopodobieństwo przeżycia



Liczba próbek	290	266	223	185	143	117	90	64	47	32	24	16	14	7	6	5	0	0	0
Fluoro/Cisp	290	266	223	185	143	117	90	64	47	32	24	16	14	7	6	5	0	0	0
Tras/Fluoro/Cisp	294	277	246	209	173	147	113	90	71	56	43	30	21	13	12	6	4	1	0

Grupa leczonych      - - - - - Fluoro/Cisp      ———— Tras/Fluoro/Cisp

**Rysunek 1.** Krzywa Kaplana-Meiera opisująca OS (n=584).

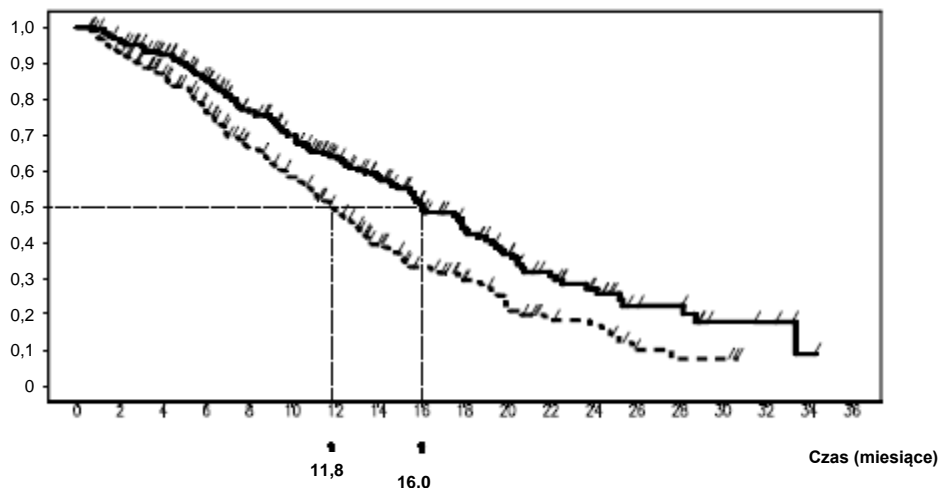
Gdy dane stały się dostępne, wykonano wstępnie sprecyzowane analizy badanej podgrupy pod kątem ich statusu HER2. Nowe dwie podgrupy HER2 zdefiniowano później w oparciu o klasyfikację IHC:

**Grupa 1 („grupa z niską ekspresją HER2”):** IHC 0/FISH+ oraz IHC 1+/FISH+ (n=131)

**Grupa 2 („grupa z wysoką ekspresją HER2”):** IHC 2+/FISH+ oraz IHC 3+ (FISH+ lub FISH- lub brak wyniku FISH (n=446))

Późniejsze powtórzenie wyników analizy okresu przeżycia (OS) w przypadku „grupy z wysoką ekspresją HER2” (n=446) wykazało jeszcze większą przewagę metody połączonej. Mediana OS dla grupy pacjentów przyjmujących chemioterapię oraz preparat trastuzumab wzrosła do 16,0 miesięcy w porównaniu z 11,8 miesiąca w przypadku pacjentów z samą chemioterapią. Współczynnik ryzyka w przypadku tej metody obniżył się do 0,65 (95 % CI: 0,51–0,83). Krzywe Kaplana-Meiera opisujące OS dla „grupy z wysoką ekspresją HER2” są pokazane na Rysunku 2.

Prawdopodobieństwo przeżycia



Liczba próbek	218	198	170	141	112	96	75	53	39	28	20	13	11	4	3	3	0	0	0
Fluoro/Cisp	218	198	170	141	112	96	75	53	39	28	20	13	11	4	3	3	0	0	0
Tras/Fluoro/Cisp	228	218	196	170	142	122	100	84	65	51	39	28	20	12	11	5	4	1	0

Grupa leczonych      - - - - - Fluoro/Cisp      ———— Tras/Fluoro/Cisp

**Rysunek 2.** Krzywe Kaplana-Meiera opisujące OS dla „grupy z wysoką ekspresją HER2” (n=446).

Badania ToGA wykazały, że połączenie metod testowych IHC i FISH jest obiecujące w przypadku łączonego leczenia chemioterapią i preparatem trastuzumab, jednak analiza statystyczna oparta na nadmiernej ekspresji białka HER2 wykazuje dobre rokowania. Otrzymane wyniki wskazują, że białko jest punktem wyjścia dla preparatu trastuzumab. Więcej informacji na temat badań ToGA można znaleźć w ulotce dołączonej do opakowania Herceptin®.

## Powtarzalność

### Powtarzalność w jednej serii odczynów

Powtarzalność w ramach jednej serii odczynów testowano w jednym laboratorium na 3 próbkach dających różne odczyny w metodzie IHC. Każda próbka była badana trzykrotnie. Odczyny wykonywano metodą automatyczną. Dla wszystkich próbek uzyskano 100% powtarzalność wyników. Powtarzalność w ramach jednej serii odczynów testowano w jednym laboratorium na 11 próbkach dających różne odczyny w metodzie IHC. Każda próbka była badana trzykrotnie. Odczyny wykonano metodą ręczną. Dla wszystkich próbek uzyskano 100% powtarzalność wyników.

### Odtwarzalność pomiędzy seriami i laboratoriami:

Analizę HercepTest™ 60 różnych próbek raka żołądka, w tym połączenia żołądkowo-przelykowego, uzyskanych podczas operacji lub biopsji, przeprowadzono w pięciu dniach, nie następujących po sobie, w trzech różnych ośrodkach. Wśród 60 próbek z badania rozkład trzech kategorii statusu HER2 był równomierny. Sześciu patologów wykonało łącznie 2040 ocen HER2.

Zgodność wyników pomiędzy dniami badań (ujemny, wątpliwy, dodatni) wynosiła od 83,1% do 98,3%. W 47 z 60 możliwych porównań stopień zgody wynosił przynajmniej 90,0%. Tabela 11 ukazuje poszczególne przykłady porównań wyników badań pomiędzy dniami ze średnią zgodnością 91,2%, 92,5% i 92,5% dla trzech ośrodków.

Pomiędzy ośrodkami uzyskano odpowiednio zgodność równą 82,7%, 75,0% i 88,0% przy porównaniu parami (patrz Tabela 12). Zgodnie z dokładnym testem Fishera, wyniki nie różniły się pomiędzy ośrodkami.

Pomiędzy obserwatorami uzyskano odpowiednio zgodność równą 88,0%, 83,6% i 81,0% w trzech ośrodkach (Tabela 13).

Podsumowując, analiza HercepTest™ próbek raka żołądka w trzech ośrodkach wykazała wysoki poziom zgodności pomiędzy patologami, dniami badania, ośrodkami i obserwatorami.

**Tabela 11. Ogólna zgodność pomiędzy dniami w procentach - podzbiór 12 z 60 porównań**

		Obserwator 1		Obserwator 2		Średnia Zgodność
		Zgodność	CI95 LL <sup>1</sup>	Zgodność	CI95 LL <sup>1</sup>	
Ośrodek 1	Dzień 1 a dzień 2	85,0	74,4	93,3	84,9	91,2
	Dzień 3 a dzień 4	93,3	84,9	93,3	84,9	
Ośrodek 2	Dzień 1 a dzień 2	95,0	87,3	83,1	72,0	92,5
	Dzień 3 a dzień 4	96,7	89,7	95,0	87,3	
Ośrodek 3	Dzień 1 a dzień 2	90,0	80,5	91,7	82,7	92,5
	Dzień 3 a dzień 4	96,7	89,7	91,7	82,7	

<sup>1</sup>CI95 LL: 95% dolna granica przedziału ufności.

**Tabela 12. Ogólna zgodność pomiędzy ośrodkami w procentach**

		Zgodność	CI95 LL <sup>1</sup>	Średnia Zgodność
Ośrodek 1 a ośrodek 2	Dzień 1 a dzień 1	83,3	72,4	
	Dzień 2 a dzień 2	85,0	74,4	
	Dzień 3 a dzień 3	85,0	74,4	
	Dzień 4 a dzień 4	81,7	70,5	
	Dzień 5 a dzień 5	78,3	66,7	
Ośrodek 1 a ośrodek 3	Dzień 1 a dzień 1	80,0	68,6	75,0
	Dzień 2 a dzień 2	73,3	61,2	
	Dzień 3 a dzień 3	78,3	66,7	
	Dzień 4 a dzień 4	68,3	55,9	
	Dzień 5 a dzień 5	75,0	63,0	
Ośrodek 2 a ośrodek 3	Dzień 1 a dzień 1	88,3	78,5	88,0
	Dzień 2 a dzień 2	86,7	76,4	
	Dzień 3 a dzień 3	90,0	80,5	
	Dzień 4 a dzień 4	86,7	76,4	
	Dzień 5 a dzień 5	88,3	78,5	

<sup>1</sup>CI95 LL: 95% dolna granica przedziału ufności.

Tabela 13. Ogólna zgodność pomiędzy obserwatorami w procentach

		Zgodność	CI 95 LL <sup>1</sup>	Średnia Zgodność
Ośrodek 1	Dzień 1	91,7	82,7	88,0
	Dzień 2	91,7	82,7	
	Dzień 3	93,3	84,9	
	Dzień 4	83,3	72,4	
	Dzień 5	80,0	68,6	
Ośrodek 2	Dzień 1	86,4	76,0	83,6
	Dzień 2	83,3	72,4	
	Dzień 3	83,3	72,4	
	Dzień 4	83,3	72,4	
	Dzień 5	81,7	70,5	
Ośrodek 3	Dzień 1	80,0	68,6	81,0
	Dzień 2	78,3	66,7	
	Dzień 3	80,0	68,6	
	Dzień 4	78,3	66,7	
	Dzień 5	90,0	80,5	

<sup>1</sup>CI95 LL: 95% dolna granica przedziału ufności.

#### Immunoreaktywność

W Tabeli 14 przedstawiono zbiorcze informacje na temat immunoreaktywności testu HercepTest™ z zalecanym panelem tkanek prawidłowych. Wszystkie preparaty utrwalano w formalinie i zatapiano w parafinie. Następnie wykonywano odczyn przy użyciu testu HercepTest™, zgodnie z zaleceniami przedstawionymi w ulotce dołączonej do opakowania.

Tabela 14. Zestawienie reaktywności testu HercepTest™ dla tkanek normalnych.

Rodzaj tkanki (liczba testowanych przypadków)	Struktura wykazująca dodatni odczyn oraz rodzaj odczynu
Nadnerczowa (3)	Brak
Szpicz kostny (3)	Brak
Mózgowa/mózdzkowa (3)	Brak
Mózgowa/mózgowa (3)	Brak
Piersiowa (3)	Gruczoł sutkowy (1 tkanka z 3, natężenie wybarwienia 1–2+, > 10% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny (słaby))
Szyjki macicy (3)	Brak
Okreźnicy (3)	Brak
Przełyku (3)	Brak
Sercowa (3)	Brak
Nerkowa (3)	Brak
Wątrobowa (3)	Brak
Płucna (3)	Brak
Komórek mezotelialnych (3)	Brak
Jajnikowa (3)	Brak
Trzustkowa (3)	Brak
Przyczrnyce (3)	Komórki nabłonkowe (2 tkanki z 3, natężenie wybarwienia 1–2+, 10–50% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny, szczytowy ziarnisty)
Nerwu obwodowego (3)	Brak
Przysadkowa (3)	Brak
Prostaty (3)	Brak
Gruczołu ślinowego (3)	Brak
Mięśnia szkieletowego (3)	Brak
Skóra (3)	Nabłonek (3 tkanki z 3, natężenie wybarwienia 1–2+, > 10% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny, ziarnisty)
Jelita cienkiego (3)	Brak
Śledziony (3)	Brak
Żołądek (3)	Komórki główne (1 tkanka z 3, natężenie wybarwienia 2–3+, > 10% komórek, odczyn cytoplazmatyczny, ziarnisty)
Jąder (3)	Brak
Grasicy (3)	Brak
Tarczycy (3)	Brak
Migdałki (3)	Nabłonek płaski (2 tkanki z 3, natężenie wybarwienia 2+, > 10% komórek, odczyn błonowy i cytoplazmatyczny)
Maciczna (3)	Tkanki endometrium (1 tkanka z 3, natężenie wybarwienia 1–2+, 50–75% komórek, odczyn cytoplazmatyczny, ziarnisty)

O ile nie zaznaczono inaczej, we wszystkich tkankach stwierdzano odczyn błonowy. O ile nie zaznaczono inaczej, wszystkie trzy próbki każdego rodzaju tkanki dawały odczyn o tym samym nasileniu.

<i>Problem</i>	<i>Prawdopodobna przyczyna</i>	<i>Zalecane postępowanie</i>
1. Brak barwienia preparatów.	<p>1a. Błąd programowania. Odczynniki nie są używane we właściwej kolejności.</p> <p>1b. Obecność azydku sodu w roztworze płuczającym.</p> <p>1c. Nadmierne ogrzewanie skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach przed odparafinowaniem i ciepłym odmaskowaniem antygeny może doprowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności HER2.</p>	<p>1a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy wybrano właściwy program.</p> <p>1b. Używać tylko roztworu Dako Wash Buffer, nr kat. S3006.</p> <p>1c. Pozostawić na powietrzu skrawki tkankowe w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin lub do całkowitego wysuszenia. Lub suszyć w temperaturze 37 °C przez noc albo suszyć w temperaturze 60 °C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła (17).</p>
2. Słabe barwienie preparatów.	<p>2a. Niedostateczne odmaskowanie antygeny.</p> <p>2b. Niedostateczny czas inkubacji.</p> <p>2c. Użyto niewłaściwej metody utrwalaania.</p> <p>2d. Nadmierne ogrzewanie skrawków tkankowych zatopionych na szkiełkach przed odparafinowaniem i ciepłym odmaskowaniem antygeny może doprowadzić do widocznej utraty immunoreaktywności HER2</p> <p>2e. Naniesiono niedostateczną objętość odczynnika.</p>	<p>2a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy prawidłowo przeprowadzono odmaskowanie antygeny.</p> <p>2b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji odczynników były prawidłowe.</p> <p>2c. Dopiłnować, by tkanki pacjenta nie były poddawane nadmiernemu utrwalaaniu i nie stosować alternatywnych substancji utrwalaających.</p> <p>2d. Pozostawić na powietrzu skrawki tkankowe w temperaturze pokojowej przez min. 12 godzin lub do całkowitego wysuszenia. Lub suszyć w temperaturze 37 °C przez noc albo suszyć w temperaturze 60 °C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w piecu z regulacją temperatury i równomiernym rozkładem ciepła (17).</p> <p>2e. Sprawdzić wielkość skrawka tkankowego (22 mm x 22 mm) i naniesioną objętość odczynnika</p>
3. Nadmierne barwienie tła w preparatach.	<p>3a. Niecałkowicie usunięta parafina.</p> <p>3b. Podczas zatapiania skrawków zastosowano pochodne skrobi.</p> <p>3c. Preparaty nie są odpowiednio przepłukiwane.</p> <p>3d. Wysychanie skrawków podczas wykonywania odczynu.</p> <p>3e. Użyto niewłaściwej metody utrwalaania.</p> <p>3f. Nieswoiste wiązanie odczynników do tkanki.</p>	<p>3a. Stosować świeże roztwory do odparafinowania.</p> <p>3b. Unikać stosowania zawierających skrobię dodatków zwiększających przyczepność skrawków do szkiełek mikroskopowych. Wiele dodatków wykazuje immunoreaktywność.</p> <p>3c. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy preparaty były odpowiednio płukane.</p> <p>3d. Dopiłnować, by na szkiełka były nanoszone odpowiednie objętości odczynnika.</p> <p>3e. Stosować tylko zatwierdzone środki utrwalaające. Alternatywne środki utrwalaające mogą powodować silny odczyn tła.</p> <p>3f. Sprawdzić metodę utrwalaania próbki oraz wykluczyć obecność tkanek martwiczych w próbce.</p>

<i>Problem</i>	<i>Prawdopodobna przyczyna</i>	<i>Zalecane postępowanie</i>
4. Tkanka oddziela się od szkiełka.	4a. Zastosowano niewłaściwe szkiełka mikroskopowe.	4a. Używać szkiełek silanizowanych, takich jak Dako Silanized Slides, (nr kat. S3003), SuperFrost Plus lub szkiełek powlekanych poli-L-lizyną.
5. Nadmiernie silny odczyn swoisty.	5a. Użyto niewłaściwej metody utrwalania. 5b. Zbyt długie czasy inkubacji odczynników. 5c. Użyto niewłaściwego roztworu płuczającego.	5a. Dopilnować, by były stosowane jedynie odpowiednie substancje utrwalające i metody utrwalania 5b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji odczynników były prawidłowe. 5c. Używać tylko roztworu Dako Wash Buffer, nr kat. S3006.
6. Słaby odczyn kontrolnej linii komórkowej 1+.	6a. Zastosowano nieprawidłowy protokół odmaskowania antygenu. 6b. Brak reakcji z roztworem substratu-chromogenu (DAB). 6c. Rozkład preparatu kontrolnego.	6a. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy prawidłowo przeprowadzono odmaskowanie antygenu. 6b. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy chromogen został prawidłowo przygotowany. Sprawdzić w rejestrze preparatów, czy czasy inkubacji chromogenu był prawidłowy. 6c. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu podane na zewnątrz opakowania.
7. Po ogrzaniu roztworu Epitope Retrieval Solution pojawia się zmętnienie.	7. Po ogrzaniu roztworu pojawia się zmętnienie.	7. Jest to normalne zjawisko, które nie ma wpływu na wynik barwienia.
8. Przy przechowywaniu (przed ogrzaniem) roztwór Epitope Retrieval Solution jest mętny.	8. Roztwór był nieprawidłowo przechowywany lub jest przeterminowany.	8. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu podane na zewnątrz opakowania. Usunąć roztwór epitope retrieval solution.

**UWAGA:** Jeśli problemu nie daje się przypisać żadnej z powyższych przyczyn, bądź jeśli zalecane postępowanie jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Dako w celu uzyskania dalszej pomocy.

Dodatkowe informacje na temat technik wykonywania odczynów i przygotowywania próbek można znaleźć we wspomnianym wcześniej podręczniku (19) (dostępnym w firmie Dako), atlasie Atlas of Immunohistology (29) oraz publikacji Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis (30).



1. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 1985; 230:1132
2. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel *v-erbB*-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; 229:974
3. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A *v-erbB*-related protooncogene, *c-erbB-2*, is distinct from the *c-erbB-1*/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6497
4. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319:230
5. Schechter AL, Hung M-C, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, et al. The *neu* gene: an *erbB*-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 229:976
6. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319:226
7. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Venturo I, Slamon DJ, Fendly BM, et al. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 1990; 45:457
8. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/*neu* proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5:953
9. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal *erbB-2* product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2:992
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185<sup>HER2</sup> antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4285
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989; 9:1165
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 37:255
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/*neu* overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58:2825
14. a. Medical Laboratories – Particular requirements for quality and competence, ISO 15189:2003  
b. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57CFR7163, February 28, 1992
15. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: The C. V. Mosby Company; 1980
16. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory & practice. New York: Pergamon Press 1981
17. Lundgaard Hansen B, Winther H, Moller K. Excessive section drying of breast cancer tissue prior to deparaffinisation and antigen retrieval causes a loss in HER2 immunoreactivity. *Immunocytochemistry* 2008;6,119-22.
18. Dako California Inc., Data on file
19. Key M. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Fourth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2006
20. Leong AS-Y, Milios J, Leong FJ. Epitope retrieval with microwaves. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem* 1996; 4:201
21. 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
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2005
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. CLSI document MM4-A (1-56238-396-5) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1999
24. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special report: quality control in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:836
25. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: Part I. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767
26. 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 Pathol* 1980; 73:626
27. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194
28. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/*neu* antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54:2771
29. Tubbs RR, Gephardt GN, Petras RE. Specimen processing and quality assurance. *Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press; 1986: 16
30. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press; 1986

31. Jørgensen JT. Targeted HER2 Treatment in Advanced Gastric Cancer. *Oncology* 2010 (in press).
32. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tomola S, Soini Y et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II alpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005;16: 273-278.
33. Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol* 2005; 27: 681-685.
34. Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mor K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 795-805.
35. Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh DY, Im S-A, Lee D et al. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol* 2008; 32: 89-95.
36. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-esophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Lancet* 2010.
37. Bang Y, Chung J, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et al. Pathological features of advanced Gastric Cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:15s (suppl; abstr 4556).
38. Van Cutsem E, Kang YK, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, et al. Efficacy results from the ToGA trial: a phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer. (presentation ASCO 2009).
39. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopath* 2008;52:797-805.
40. Asioli S, Maletta F, Verdun di Cantogno L, Satolli MA, Schena M, Pecchioni C, et al. Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer. *Human Pathol* 2012; 43;11: 2070-2079.

## Objaśnienie symboli

 Numer katalogowy	 Temperatura przechowywania	 Numer serii	 Ostrożnie, szkło!
 Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	 Przechowywać w ciemności	 Zużyć przed	 Piktogram zagrożeni GHS ( <i>dział środki ostrożności</i> )
 Sprawdzić w instrukcji stosowania	 Zawartość wystarcza na <n> testów	 Producent	 Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



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

Wersja 2020.11