

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis)

Nr kat. GE001

50 testów do stosowania w urządzeniu Dako Omnis

Do stosowania w diagnostyce in vitro

Spis treści

1.	Przeznaczenie.....	3
2.	Podsumowanie i wyjaśnienie.....	3
3.	Zasada procedury.....	3
4.	Dostarczane materiały.....	3
5.	Materiały wymagane, ale niedostarczane.....	4
6.	Odczynnik opcjonalny.....	5
7.	Zamienniki dla komponentów zestawu.....	5
8.	Środki ostrożności.....	5
9.	Przechowywanie.....	6
10.	Przygotowanie próbek.....	6
10.1	Skrawki zatopione w parafinie.....	6
10.2	Skrawki tkankowe.....	6
11.	Przygotowanie odczynników.....	7
12.	Procedura barwienia w urządzeniu Dako Omnis.....	7
12.1	Uwagi dotyczące procedury.....	7
12.2	Procedura przed barwieniem.....	7
12.3	Protokół barwienia.....	8
12.4	Procedura po barwieniu.....	8
13.	Kontrola jakości.....	8
13.1	Preparat kontrolny (dostarczony),.....	8
13.2	Tkankowa kontrola dodatnia.....	8
13.3	Tkankowa kontrola ujemna.....	9
13.4	Odczynnik do nieswoistej kontroli ujemnej Negative Control Reagent (opcjonalny).....	9
13.5	Weryfikacja testu.....	9
14.	Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali.....	9
15.	Ocena tkanki.....	9
15.1	Ocena preparatu kontrolnego (w zestawie).....	10
15.2	Dodatkowe zalecenia dotyczące interpretacji barwienia z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis).....	11
16.	Ograniczenia.....	11
16.1	Ograniczenia ogólne.....	11
16.2	Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu.....	12
17.	Charakterystyka działania.....	12
17.1	Czułość analityczna.....	12
17.2	Swoistość analityczna.....	12
17.3	Dokładność.....	13
18.	Charakterystyka skuteczności klinicznej.....	14
18.1	Ocena skuteczności, porównanie metod IHC.....	14
18.2	Ocena skuteczności, porównanie metody IHC z metodą FISH.....	14
19.	Rozwiązywanie problemów.....	15
20.	Piśmiennictwo.....	16
21.	Objaśnienia symboli.....	18

1. Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) jest półilościowym testem immunohistochemicznym opartym na pierwotnych monoklonalnych przeciwciałach króliczych (klon DG44) oraz swoistym odczynnikiem do wizualizacji. Test określa nadekspresję białka HER2 w tkankach raka piersi utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE), poddawanych obróbce w celu oceny histologicznej. HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) jest pomocny w ocenie pacjentów z rakiem sutka, u których rozważane jest podjęcie leczenia lekiem Herceptin® (trastuzumab) (zob. ulotka dołączona do opakowania leku Herceptin®).

HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) jest przeznaczony do automatycznej procedury barwienia w urządzeniu Dako Omnis.

HercepTest™ i Herceptin® to znaki handlowe należące do firmy Genentech, Inc. i/lub F. Hoffmann-La Roche Ltd.; HercepTest™ podlega wyłącznej licencji na znak handlowy firmy Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.

Licencjonowane przeciwciało jest wytwarzane przez Epitomics Inc. (firma Abcam) z wykorzystaniem zastrzeżonej dla Abcam technologii króliczych przeciwciał monoklonalnych objętych patentem nr 5,675,063 i 7,402,409.

2. Podsumowanie i wyjaśnienie

Ludzki gen *HER2* (znany także jako *ERBB2* lub *NEU*) koduje białko o nazwie HER2 lub p185HER2. Białko HER2 jest receptorem błonowym kinazy tyrozynowej wykazującym homologię do receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR lub HER1)¹⁻³. Białko HER2 jest typowym składnikiem komórkowym, wykazującym ekspresję w różnych typach komórek nabłonkowych³. U pewnego odsetka chorych na raka sutka białko HER2 ulega nadekspresji w procesie złośliwej transformacji i rozrostu guza⁴. Nadekspresja białka HER2 na powierzchni komórek raka sutka stała się punktem wyjścia do opracowania metody leczenia przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku.

Herceptin® (trastuzumab) to humanizowane przeciwciało monoklonalne⁵, które wiąże się z białkiem HER2, wykazując do niego silne powinowactwo. W badaniach in vitro i in vivo wykazano, że przeciwciało to blokuje rozrost ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję białka HER2⁶⁻⁸. W wielu badaniach klinicznych wykazano, że trastuzumab jest skuteczny i bezpieczny w leczeniu pacjentów z HER2-dodatnim rakiem sutka⁹⁻¹².

Wynik testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) w kierunku nadekspresji białka HER2 interpretuje się jako ujemny (nasilenie odczynu 0 i 1+), słabo dodatni (nasilenie odczynu 2+) albo silnie dodatni (nasilenie odczynu 3+). Test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) nie jest przeznaczony do dostarczania informacji prognostycznych pacjentowi i lekarzowi i nie został zatwierdzony do tego celu.

3. Zasada procedury

Test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) zawiera odczynniki i protokół wymagany do wykonania w pełni automatycznej procedury barwienia immunohistochemicznego skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie w urządzeniu Dako Omnis. Po inkubacji z gotowym do użycia, pierwotnym monoklonalnym przeciwciałem króliczym skierowanym przeciwko HER2 (klon DG44) stosowany jest zawarty w zestawie swoisty, gotowy do użycia odczynnik do wizualizacji oparty na technologii dekstranu bez biotyny. W skład odczynnika wchodzi cząsteczki wtórnych przeciwciał kozich skierowanych przeciw immunoglobulinom króliczym oraz cząsteczki peroksydazy chrzanowej sprzężone z polimerowym szkieletem dekstranowym. W ten sposób wyeliminowano konieczność sekwencyjnego stosowania przeciwciała wtórnego i koniugatu peroksydazy. Po dodaniu odczynnika DAB+ chromogen następuje reakcja enzymatyczna, której wynikiem jest precypitacja widocznego produktu reakcji w miejscu występowania antygenu. Następnie próbkę można poddać barwieniu kontrastowemu i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki reakcji ocenia się przy użyciu mikroskopu do obserwacji metodą jasnego pola. Dostarczane są gotowe do użycia preparaty kontrolne Control Slides zawierające cztery utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie linie komórkowe ludzkiego raka sutka do weryfikacji działania odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciało pierwotne i odczynnik do wizualizacji) po załadowaniu lub ponownym załadowaniu odczynników do urządzenia Dako Omnis. Te cztery linie komórkowe wykazują różne poziomy ekspresji białka HER2 i, w związku z tym, różne nasilenia odczynu, które obejmują brak odczynu HER2 (odczyn ujemny), oraz odczyn HER2 o słabym, umiarkowanym i dużym nasileniu.

Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat ładowania i rozładowywania preparatów, odczynników, płynów i ścieków, należy zapoznać się z podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis.

4. Dostarczane materiały

Wyszczególnione poniżej materiały są wystarczające do wykonania 50 testów: 50 preparatów tkankowych, 10 preparatów kontrolnych Control Slides inkubowanych z przeciwciałem pierwotnym skierowanym przeciwko HER2, 10 preparatów inkubowanych z opcjonalnym odczynnikiem do kontroli ujemnej Negative Control Reagent (patrz rozdział 6, Odczynnik opcjonalny). Zestaw jest przeznaczony do stosowania z urządzeniami Dako Omnis. Dodatkowe informacje można znaleźć w podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

Ilość
1 x 22,5 mL

Opis

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

HercepTest™ mAb pharmDx

EnVision FLEX

Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)

Bufor fosforanowy zawierający nadtlenek wodoru, 15 mmol/L Na₂S₂O₈ i detergent.

1 x 12 mL

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

HercepTest™ mAb pharmDx

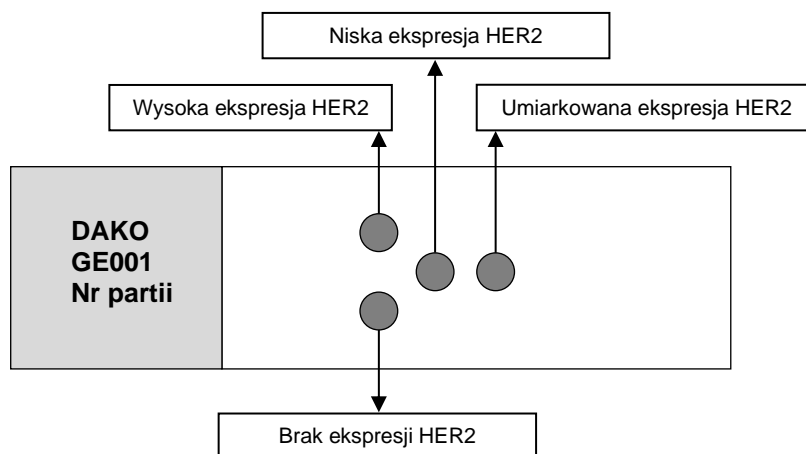
Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)

Ready-to-use Monoclonal Antibody, Clone DG44. Dostarczane w 0,05 mol/L Tris/HCl, 0,1 mol/L NaCl, 15 mmol/L Na₂S₂O₈, zawierające białko stabilizujące.

Immunogen: syntetyczny fragment C-końcowy (część cytoplazmatyczna) receptora HER2.

Swoistość: białko HER2. Metoda puryfikacji: puryfikacja białka A.

Ilość 1 x 22,5 mL	<p>Opis</p> <p>VISUALIZATION REAGENT (Dako Omnis)</p> <p>HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis)</p> <p>Wyzolowane metodą powinowactwa cząsteczki wtórnych przeciwciał kozich skierowanych przeciw immunoglobulinom króliczym oraz cząsteczki peroksydazy chrzanowej sprzężone z polimerowym szkieletem dekstranowym. Dostarczany w buforze Tris/HCl zawierającym białko stabilizujące i środek przeciwbakteryjny.</p>
1 x 1 mL	<p>EnVision FLEX DAB+ CHROMOGEN (Dako Omnis)</p> <p>HercepTest™ mAb pharmDx EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)</p> <p>Tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzydyny w rozpuszczalniku organicznym. Odczynnik ten może mieć różny kolor, od wyraźnie fioletowego do bezbarwnego, nie ma to jednak wpływu na reakcję wizualizacji.</p>
2 x 26 mL	<p>EnVision FLEX SUBSTRATE BUFFER (Dako Omnis)</p> <p>HercepTest™ mAb pharmDx EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)</p> <p>Roztwór buforowany zawierający nadtlenek wodoru i środek konserwujący.</p>
3 x 68 mL	<p>EnVision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (50x) (Dako Omnis)</p> <p>HercepTest™ mAb pharmDx EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)</p> <p>Bufor cytrynianowy. Każda butelka zawiera 68 mL koncentratu odczynnika (50x). Objętość jest optymalna do rozcieńczania w butelkach zbiorczych Dako Omnis.</p>
2 x 5 szkiełek	<p>CONTROL SLIDES (Dako Omnis)</p> <p>HercepTest™ mAb pharmDx Control Slides (Dako Omnis)</p> <p>Każde gotowe do użycia preparaty kontrolne Control Slides zawierają skrawki czterech utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie linii komórkowych raka sutka (kontrolnych linii komórkowych) prezentujących różne poziomy ekspresji białka HER2: MDA-231 (odczyn ujemny, brak ekspresji HER2), MDA-175 (niska ekspresja HER2), MDA-453 (umiarkowana ekspresja HER2) i SK-BR-3 (wysoka ekspresja HER2). Preparaty kontrolne Control Slides zostały poddane obróbce cieplnej w celu uzyskania lepszego przylegania skrawków do szkiełek. Jakkolwiek dodatkowa obróbka cieplna preparatów kontrolne Control Slides przed rozpoczęciem testu może negatywnie wpłynąć na wyniki barwienia.</p>



UWAGA: przeciwciało pierwotne (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)), odczynnik HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis) i preparaty kontrolne HercepTest™ mAb pharmDx Control Slides (Dako Omnis) zostały specjalnie przygotowane do użycia z tym testem. Warunkiem prawidłowego działania testu jest niestosowanie zamienników wymienionych komponentów. Te trzy komponenty charakteryzuje ograniczenie partii, co oznacza, że muszą posiadać ten sam numer partii. Możliwe do użycia roztwory odczynników dla pozostałych komponentów zestawu wymieniono poniżej w rozdziale 7, Zamienniki dla komponentów zestawu.

5. Materiały wymagane, ale niedostarczane

Urządzenie Dako Omnis (nr kat. G1100)
 Bufor płuczący Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (nr kat. GC807)
 Środek czyszczący Clearify™ Clearing Agent (nr kat. GC810)

Odczynnik Hematoxylin (Dako Omnis) (nr kat. GC808) lub odczynnik równoważny
 Kwas siarkowy Dako Omnis Sulfuric Acid, 0,3 M (nr kat. GC203)
 Szkiełka mikroskopowe: FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus
 Woda destylowana lub dejonizowana (woda o jakości odpowiedniej dla odczynników)
 Piec suszący umożliwiający utrzymanie temperatury 60°C lub niższej
 Etanol
 Mikroskop jasnego pola (powiększenie obiektywu 4–40x)
 Materiały do zatapania: zalecane jest trwale zatapanie, ale zatapanie nietrwale jest również dopuszczalne.
 Tkanki do kontroli dodatnich i ujemnych (patrz rozdział 13, Kontrola jakości)
 Stoper
 Ksylen, toluen lub zamienniki ksylenu

6. Odczynnik opcjonalny

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis), nr kat. GA600, określany w tym dokumencie jako Negative Control Reagent.

7. Zamienniki dla komponentów zestawu

Odczynnik EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), fiolka DM841 (nr kat. GV800/GV823/GV900)
 Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), fiolka DM849 (nr kat. GV805)
 Odczynnik EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), fiolka DM847 (nr kat. GV800/GV823/GV825)
 Bufor EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), fiolka DM843 (nr kat. GV800/GV823/GV825/GV900/GV925)

8. Środki ostrożności

- Do badań diagnostycznych in vitro.
- Do stosowania przez wyszkolony personel.
- Opisywany produkt zawiera silnie toksyczny w czystej postaci związek chemiczny – azydek sodu (NaN_3). Azydek sodu zastosowany w produkcji w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydków metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydków metali w kanalizacji¹³.
- Przeciwciała HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis) i odczynnik HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis) zawierają materiały pochodzenia zwierzęcego. Podobnie jak w przypadku wszelkich materiałów pochodzących ze źródeł biologicznych, należy stosować właściwe procedury postępowania.
- Gotowe do użycia odczynniki mają optymalne rozcieńczenia. Dalsze rozcieńczanie może skutkować utratą zdolności barwienia antygenów.
- Preparaty kontrolne Control Slides i próbki (przed i po utrwaleniu) oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt powinny być traktowane jako mogące przenosić zakażenia i utylizowane z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności¹⁴. Nigdy nie należy pipetować odczynników, posługując się ustami. Unikać kontaktu odczynników i skrawków ze skórą i błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników z wrażliwymi okolicami skóry należy je spłukać obfitą ilością wody.
- Preparaty kontrolne Control Slides zostały poddane obróbce cieplnej w celu uzyskania lepszego przylegania skrawków do szkiełek. Jakakolwiek dodatkowa obróbka cieplna preparatów kontrolnych może negatywnie wpłynąć na wyniki barwienia.
- Stosowanie innych od opisanych czasów inkubacji, objętości, temperatury lub metod może prowadzić do uzyskiwania błędnych wyników. Nadmierne suszenie w temperaturze $\geq 60^\circ\text{C}$ przez ponad jedną godzinę może spowodować znaczne zmniejszenie lub utratę swoistej immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym¹⁵.
- Wszelkie odchylenia od oceny wybarwienia i interpretacji wartości skali (rozdział 14) oraz zaleceń dotyczących interpretacji (rozdział 15.2) mogą prowadzić do uzyskiwania błędnych wyników.
- Unikać zanieczyszczeń mikrobiologicznych odczynnika. W przeciwnym razie może dojść do nasilenia nieswoistego odczynu.
- Ekspozycja na nadmierne światło może mieć negatywny wpływ na odczynniki EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis), EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) i EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis). Nie należy przechowywać elementów urządzenia ani przeprowadzać barwienia w miejscach silnie naświetlonych, np. w bezpośrednim świetle słonecznym.
- Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.
- W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
- Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.
- Zasadniczo zakazuje się pracy z produktem osobom poniżej 18. roku życia. Użytkownicy muszą być szczegółowo przeszkoleni w zakresie prawidłowych procedur postępowania, niebezpiecznych właściwości produktu i niezbędnych środków ostrożności. Dodatkowe informacje zawiera Karta charakterystyki substancji.
- Karty charakterystyki substancji są dostępne na stronie www.agilent.com lub na żądanie.
- Odczynnik HercepTest™ mAb pharmDx Visualization Reagent (Dako Omnis)** posiada następujące oznaczenia:
Karty charakterystyki substancji są dostępne na żądanie.
- Odczynnik EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)** posiada następujące oznaczenia:
Karty charakterystyki substancji są dostępne na żądanie.
- Odczynnik EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)** posiada następujące oznaczenia:



Niebezpieczeństwo

Zawiera tetrachlorowodorek 3,3-diaminobenzyny

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

20. **EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)** posiada następujące oznaczenia:



Niebezpieczeństwo

Zawiera imidazol

H360	Może działać szkodliwie na płodność i na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne. Stosować ochronę oczu lub twarzy. Stosować odzież ochronną.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczności: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.

21. **EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)** posiada następujące oznaczenia:



1



¹Ostrzeżenie

H319 ¹	Działa drażniąco na oczy.
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P280	Stosować ochronę oczu lub twarzy.
P273	Unikać uwalniania do środowiska.
P264	Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P305+P351+P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P337+P313	W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.

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

¹ Piktogramy zagrożeń GHS07 (ostrzeżenie) i H319 mogą nie mieć zastosowania we wszystkich regionach. Patrz karta charakterystyki substancji na stronie www.agilent.com

9. Przechowywanie

Komponenty testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis), które nie są używane w urządzeniu Dako Omnis, należy przechowywać w temperaturze 2–8°C. Odczynniki EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), Visualization Reagent (Dako Omnis), EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis) i EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) należy przechowywać w ciemności. Podczas przechowywania korki każdej fiołki powinny być zamknięte. Przechowywać preparaty kontrolne Control Slides w temperaturze 2–8°C.

Nie używać zestawu po upływie daty ważności nadrukowanej na zewnętrznej powierzchni opakowania. Jeżeli odczynnik jest przechowywany w warunkach innych niż podane w instrukcjach użycia, użytkownik musi je zweryfikować.

Zatwierdzona stabilność w urządzeniu gotowych do użycia odczynników HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) wynosi 240 godzin. Po zakończeniu barwienia należy wyjąć odczynniki z urządzenia Dako Omnis, zamknąć fiołki korkami i przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C. Stabilność w urządzeniu rozcieńczonych roztworów roboczych buforu Wash Buffer (Dako Omnis) i roztworu EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) wynosi 7 dni. Czas przebywania odczynników w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis; szczegółowe informacje można znaleźć w podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

UWAGA: nie ma widocznych oznak wskazujących na niewłaściwe przechowywanie tego produktu lub postępowanie z nim w okresie przydatności do użycia produktu. Kontrole dodatnie i ujemne należy przeprowadzać jednocześnie z tkanką pacjenta, najlepiej na tym samym szkiełku, w celu monitorowania skuteczności działania produktu w okresie jego przydatności do użycia. Jeśli podejrzewa się problem z produktem w okresie jego przydatności do użycia, którego nie można wytłumaczyć niewłaściwym przechowywaniem lub postępowaniem z produktem bądź innymi odstępstwami w procedurach laboratoryjnych, należy skontaktować się z działem wsparcia histopatologicznego firmy Agilent. Więcej informacji zawarto w rozdziale 19, Rozwiązywanie problemów, oraz w rozdziale 13, Kontrola jakości.

UWAGA: w celu zweryfikowania działania odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciała pierwotne i odczynnik do wizualizacji) należy do serii barwienia włączyć preparat kontrolny HercepTest™ mAb pharmDx Control Slide (Dako Omnis) za każdym razem, gdy do urządzenia Dako Omnis ładowane są odczynniki z ograniczeniem partii.

10. Przygotowanie próbek

Z próbkami należy postępować w sposób umożliwiający zachowanie tkanki do barwienia IHC. W przypadku wszystkich próbek tkankowych należy stosować standardowe metody obróbki tkanek.¹⁶ Ogólne informacje dotyczące przygotowania próbek zawiera poradnik szkoleniowy firmy Dako: Immunohistochemical Staining Methods¹⁷ (Metody barwienia immunohistochemicznego).

10.1 Skrawki zatopione w parafinie

Tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie nadają się do użycia. Inne środki utrwalające nie zostały zatwierdzone i mogą powodować błędne wyniki. Zaleca się utrwalenie przez okres 6–48 godz. w roztworze obojętnej buforowanej formaliny. Próbkę należy przygotować w formie bloczków o grubości 3 lub 4 mm utrwalonych w formalinie, odwodnionych i oczyszczonych w serii kąpiele alkoholowych i ksylenowych, a następnie infiltrowanych płynną parafiną. Temperatura parafiny nie powinna przekraczać 60 °C. Czas utrwalania inny niż 6-48 godz. powinien być zatwierdzony przez użytkownika. Stosowanie testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na odwapnionych tkankach nie zostało zatwierdzone i nie jest zalecane.

10.2 Skrawki tkankowe

Próbki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie należy pociąć na skrawki o grubości 3–5 µm. Po pocięciu tkanek na skrawki należy je umieścić na szkiełkach mikroskopowych FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus, a następnie wysuszyć przez 1 godzinę w temperaturze 60°C.

PRZESTROGA: nadmierne ogrzewanie w temperaturze ≥60°C przez ponad jedną godzinę może spowodować znaczne zmniejszenie lub utratę swoistej immunoreaktywności HER2 związanej z odczynem błonowym.¹⁵

W celu zachowania antygenowości po osadzeniu skrawków tkankowych na szkiełkach należy je wybarwić w ciągu 8 tygodni od pocięcia i przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C. Po osadzeniu preparatów należy je przechowywać i poddawać obróbce w temperaturze nieprzekraczającej 25°C, aby zachować integralność i antygenowość tkanek. Preparaty służące do oceny ekspresji białka HER2 i weryfikacji obecności nowotworu należy przygotowywać w tym samym czasie.

Próbki tkanek należy osadzić na szkiełku w obrębie zdefiniowanego obszaru barwienia. Wymiary obszaru barwienia preparatu podano w Podstawowym podręczniku użytkownika urządzenia Dako Omnis.

11. Przygotowanie odczynników

Przed użyciem użytkownik powinien zastosować odpowiednie środki ochrony osobistej i zapoznać się ze wszystkimi komponentami zestawu (patrz rozdział 8, Środki ostrożności).

Przed rozpoczęciem barwienia zaleca się przygotowanie roztworów roboczych następujących odczynników:

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) (nr kat. GE001)

Przygotować wystarczającą ilość roztworu 1x Target Retrieval Solution, Low pH, przez rozcieńczenie roztworu EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), w stosunku 1:50 z użyciem wody destylowanej lub dejonizowanej.

1. Napełnić butelkę na płyny 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako PTB (jasnoniebieska etykieta) do linii napełnienia wodą destylowaną lub dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płynie na płaskiej powierzchni.
2. Przełać zawartość butelki 68 mL z koncentratem EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) do butelki na płynie.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płynie. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płynie do góry dnem 2–3 razy.
4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych Dako Omnis do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę).
5. Załadować butelkę na płynie do urządzenia Dako Omnis. Dokładne instrukcje ładowania i rejestracji odczynnika w urządzeniu Dako Omnis znajdują się w Podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Czas w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis. Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. Jeśli odczynnik jest przechowywany w warunkach innych niż podane powyżej, użytkownik powinien zweryfikować te warunki. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do temperatury co najmniej 18°C.

UWAGA: w przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

Bufor Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (nr kat. GC807)

Przygotować wystarczającą ilość buforu Wash Buffer do etapów płukania poprzez rozcieńczenie buforu Wash Buffer (20x) w stosunku 1:20 z użyciem wody destylowanej lub dejonizowanej.

1. Napełnić butelkę na płynie 3,5 L Dako Omnis oznaczoną jako WB (zielona etykieta) do linii napełnienia wodą destylowaną lub dejonizowaną (3,325 L). Przed napełnieniem umieścić butelkę na płynie na płaskiej powierzchni.
2. Przełać zawartość jednej butelki 175 mL koncentratu Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) do butelki na płynie.
3. Przenieść odczepianą etykietę z butelki po koncentracie na butelkę na płynie. Dokręcić nakrętkę i delikatnie odwrócić butelkę na płynie do góry dnem 2–3 razy.
4. Użyć ręcznego skanera kodów paskowych Dako Omnis do identyfikacji odczynnika (zeskanować odczepianą etykietę i butelkę).
5. Załadować butelkę na płynie do urządzenia Dako Omnis. Dokładne instrukcje ładowania i rejestracji odczynnika w urządzeniu Dako Omnis znajdują się w Podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

Jeśli rozcieńczony roztwór jest przechowywany w urządzeniu Dako Omnis, należy go zużyć w ciągu 7 dni. Czas w urządzeniu jest kontrolowany przez oprogramowanie Dako Omnis. Niewykorzystany rozcieńczony roztwór można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez jeden miesiąc. Jeśli odczynnik jest przechowywany w warunkach innych niż podane powyżej, użytkownik powinien zweryfikować te warunki. Po przechowywaniu w chłodnym miejscu należy upewnić się, że przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis rozcieńczony roztwór jest ogrzany do temperatury co najmniej 18°C.

UWAGA: w przypadku zmętnienia rozcieńczony roztwór nie nadaje się do użycia.

EnVision FLEX Substrate Working Solution

Roztwór roboczy substratów EnVision FLEX Substrate Working Solution zawierający DAB przygotowuje się w urządzeniu Dako Omnis. Jedna jednostka odczynnika EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis) zostaje automatycznie wymieszana z 50 jednostkami buforu EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis). Roztwór roboczy substratów przygotowuje się dla każdego statywu (zawierającego 1–5 preparatów).

12. Procedura barwienia w urządzeniu Dako Omnis

12.1 Uwagi dotyczące procedury

Użytkownik powinien przeczytać dokładnie niniejsze instrukcje i zapoznać się ze wszystkimi elementami oraz odnoszącymi się do nich środkami ostrożności przed użyciem urządzenia (patrz rozdział 8, Środki ostrożności).

Automatyczna procedura barwienia dla testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) obejmuje odparafinowanie skrawków tkankowych, odmaskowanie antygeny i barwienie. Preparaty są wyładowywane ze stacji wyładowywania na mokro. Wszystkie etapy protokołu zostały wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Omnis. Protokół „HercepTest™ mAb pharmDx” jest stosowany z przeciwciałem pierwotnym (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)), natomiast dla opcjonalnego odczynnika FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis) (nr kat. GA600) jest stosowany protokół „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent”. Dalsze informacje dotyczące ładowania preparatów i odczynników do urządzenia przedstawiono w Podstawowym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

Odczynnik i instrukcje dostarczane w zestawie opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników. Dodatkowe rozcieńczenie odczynników bądź nieprzestrzeganie protokołu barwienia może spowodować uzyskanie błędnych lub sprzecznych wyników. Stosowanie w laboratorium użytkownika innych niż opisane technik obróbki tkanek i procedur technicznych może spowodować unieważnienie wyników badania.

UWAGA: laboratoria znajdujące się w miejscach położonych na dużych wysokościach nad poziomem morza powinny określić najlepszą metodę utrzymywania wymaganej temperatury (95–99°C) podczas cieplnego odmaskowania antygeny. Wszelkie zmiany uwzględniające wysokość powinny być zatwierdzone przez użytkownika.

12.2 Procedura przed barwieniem

1. W oprogramowaniu stacji roboczej Dako Link Omnis wybrać protokół HercepTest™ mAb pharmDx lub Negative Control Reagent (opcja), który ma być zastosowany do każdego preparatu.

2. Upewnić się, że w oprogramowaniu stacji roboczej Dako Link Omnis Workstation skonfigurowano drukowanie etykiet preparatów z widoczną nazwą protokołu.
3. Wydrukować etykiety preparatów i przykleić je do szkiełek podstawowych.
4. Upewnić się, że preparat kontrolny Control Slide (Dako Omnis) pochodzi z tej samej partii, co odczynniki z ograniczeniem partii: Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis) i Visualization Reagent (Dako Omnis).
5. Umieścić preparaty w statywie na preparaty. W statywie na preparaty może znajdować się od jednego do pięciu preparatów.
6. Upewnić się, że w urządzeniu Dako Omnis znajdują się butelki na płyny i są w nim zarejestrowane.
 - a. Clearify™ (nr kat. GC810)
 - b. Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH, nr kat. GE001 lub fiołka DM849 (nr kat. GV805), rozcieńczony do stężenia roboczego 1x z użyciem wody destylowanej lub dejonizowanej
 - c. Bufor Wash Buffer, nr kat. GC807 rozcieńczony do stężenia roboczego 1x z użyciem wody destylowanej lub dejonizowanej
7. Przed załadowaniem wszystkich wymaganych odczynników do modułu Reagent Storage Module upewnić się, że wszystkie przykrywki korków fiolek są otwarte i zablokowane:
 - a. Odczynnik EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), nr kat. GE001 lub fiołka DM841 (nr kat. GV800/GV823/GV900)
 - b. Przeciwciało Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis), nr kat. GE001
 - c. Odczynnik Visualization Reagent (Dako Omnis), nr kat. GE001
 - d. Bufor EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), nr kat. GE001 lub fiołka DM843 (nr kat. GV800/GV823/GV825/GV900/GV925)
 - e. Odczynnik EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), nr kat. GE001 lub fiołka DM847 (nr kat. GV800/GV823/GV825)
 - f. Odczynnik Hematoxylin (Dako Omnis), nr kat. GC808 lub odczynnik równoważny
 - g. Opcjonalnie: odczynnik FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis), nr kat. GA600
 - h. Kwas siarkowy Dako Omnis Sulfuric Acid, 0,3 M, nr kat. GC203
8. Załadować statyw na preparaty do urządzenia Dako Omnis.
9. Postępować zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie dotykowym i dotknąć opcji „Gotowe”, aby rozpocząć procedurę barwienia.
10. Upewnić się, że stacja wyładunkowa preparatów jest napełniona wodą destylowaną lub dejonizowaną, aby zapobiec wysychaniu preparatów.

UWAGA: urządzenie Dako Omnis automatycznie przypisze poprzednio używany numer partii testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) do załadowanych preparatów, chyba że upłynął termin ważności partii lub została ona opróżniona. W przypadku zużycia innej partii przed upływem terminu ważności lub opróżnienia poprzednio używanej partii, dla każdego preparatu należy ręcznie wybrać nowy numer partii. Upewnić się, że nowy numer partii wybrany dla preparatów kontrolnych jest identyczny z numerem partii nadrukowanym na etykiecie preparatu kontrolnego i jest zgodny z numerem partii odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciało pierwotne i odczynnik do wizualizacji), które mają być użyte. W celu uzyskania szczegółowych informacji technicznych zapoznać się z Podstawowym podręcznikiem użytkownika Dako Omnis.

12.3 Protokół barwienia

Protokoły „HercepTest™ mAb pharmDx” i „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent” w urządzeniu Dako Omnis można monitorować z poziomu stacji roboczej Dako Link Omnis.

Preparaty należy poddać barwieniu kontrastowemu z użyciem odczynnika Hematoxylin (Dako Omnis), nr kat. GC808, lub odczynnika równoważnego Protokół HercepTest™ mAb pharmDx w urządzeniu Dako Omnis obejmuje etap barwienia kontrastowego z możliwością edycji przez użytkownika. Jeśli preferowane są inne niż zalecane barwniki kontrastowe, mogą być one użyte, jeśli zostały zatwierdzone przez użytkownika. Dalsze informacje na temat edycji protokołów są dostępne w Zaawansowanym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

12.4 Procedura po barwieniu

Nie można dopuścić do wyschnięcia skrawków przed zatapianiem. Po barwieniu w urządzeniu Dako Omnis skrawki muszą zostać odwodnione, oczyszczone i zatopione. Zalecane są metody niewodnego, trwałego zatapiania. Dopuszczalne jest jednak użycie wodnego środka do zatapiania.

UWAGA: analizę odczynu można przeprowadzić w dogodnym momencie. Niemniej jednak zastosowanie wodnego środka do zatapiania i/lub ekspozycja na światło mogą powodować blaknięcie odczynu.

13. Kontrola jakości

Odstępstwa od zalecanych w laboratorium procedur utrwalania, obróbki i zatapiania preparatów tkankowych mogą powodować istotne różnice w wynikach. Opisanie poniżej kontrole jakości obejmują dostarczane przez laboratorium tkanki do kontroli dodatnich i ujemnych oraz preparat kontrolny. Należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi kontroli jakości programu College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Dodatkowe informacje zawiera również dokument CLSI Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline Second Edition¹⁸.

13.1 Preparat kontrolny (dostarczony), należy włączyć do barwienia za każdym razem, gdy do urządzenia Dako Omnis ładowane są odczynniki z ograniczeniem partii.

Każdy z dostarczonych, gotowych do użycia preparatów kontrolnych Control Slides (Dako Omnis) zawiera osad czterech utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie linii komórkowych ludzkiego raka sutka o różnych poziomach ekspresji białka HER2 i, w związku z tym, różnych nasileniach odczynu. Te cztery linie komórkowe wykazują różne poziomy ekspresji białka HER2, tj. brak odczynu HER2 (odczyn ujemny), oraz odczyn HER2 o słabym, umiarkowanym i dużym nasileniu. Jeden preparat należy wybarwić w pierwszej serii barwienia po załadowaniu lub ponownym załadowaniu odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciało pierwotne i odczynnik do wizualizacji) do urządzenia Dako Omnis instrument. Ocena dostarczonego preparatu kontrolnego weryfikuje jedynie działanie odczynników, ale nie przygotowanie tkanek. Dalsze informacje na temat programowania barwienia preparatu kontrolnego są dostępne w Zaawansowanym podręczniku użytkownika Dako Omnis.

13.2 Tkankowa kontrola dodatnia

Tkanki do dodatniej próby kontrolnej powinny pochodzić z biopsji/resekcji chirurgicznych utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w taki sam sposób jak tkanki pacjenta. Dodatnie próby tkankowe są wskaźnikami prawidłowo przygotowanych tkanek, poprawnych technik barwienia i działania odczynników. Próbkę poddane obróbce w inny sposób niż próbka pacjenta pozwalają wyłącznie na weryfikację działania odczynników, nie umożliwiają natomiast weryfikacji prawidłowego przygotowania tkanek. Zaleca się, aby tkankowe kontrole dodatnie były barwione na tym samym szkiełku, co tkanka pacjenta. Kontrola dodatnia powinna wykazywać słaby odczyn dodatni wskazujący na zdolność do wykrycia niewielkich zmian w czułości przeciwciała pierwotnego (Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)). W charakterze tkanki do kontroli dodatniej najlepiej używać ludzkiej tkanki inwazyjnego (naciekowego) raka sutka, w której uprzednio stwierdzono nadekspresję białka HER2 z wynikiem 2+.

UWAGA: znane tkankowe kontrole dodatnie powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania jakości poddanych obróbce tkanek i odczynników, a NIE pomocniczo do formułowania rozpoznań na podstawie próbek pochodzących od pacjentów. Jeżeli nie udaje się potwierdzić dodatniego odczynu w preparatach tkankowej kontroli dodatniej, należy uznać, że wyniki próbek pochodzących od pacjentów są nieważne.

13.3 Tkankowa kontrola ujemna

Tkanki do ujemnej próby kontrolnej powinny pochodzić z biopsji/resekcji chirurgicznych utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w taki sam sposób jak tkanki pacjenta. Tkankowa kontrola ujemna powinna być stosowana w celu weryfikacji swoistości przeciwciała pierwotnego (Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis)) i dostarczyć wskazówek dotyczących odczynu tła. Zaleca się, aby kontrole ujemne były barwione na tym samym szkiełku, co tkanka pacjenta. Kontrola ujemna powinna obejmować tkankę o znanym ujemnym odczynie w kierunku HER2, potencjalne tkanki do kontroli ujemnej zamieszczone w Tabeli 4. W charakterze wewnętrznej kontroli ujemnej można wykorzystywać różne rodzaje komórek pochodzące z większości tkanek. Tkanki do kontroli ujemnej powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika. Jeśli tkanka do kontroli ujemnej lub wewnętrznej kontroli ujemnej wykazuje swoisty odczyn błonowy, wyniki dla próbek pochodzących od pacjenta należy uznać za nieważne, a test należy powtórzyć.

13.4 Odczynnik do nieswoistej kontroli ujemnej Negative Control Reagent (opcjonalny)

Odczynnik Negative Control Reagent, FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Omnis) (nr. kat GA600) może być stosowany zamiast przeciwciała pierwotnego na skrawkach próbki pochodzącej od pacjenta w celu oceny nieswoistego odczynu i ułatwienia interpretacji swoistego odczynu po stronie antygeny. W przypadku preparatów barwionych z użyciem odczynnika Negative Control Reagent należy korzystać z protokołu „HercepTest™ mAb pharmDx, Negative Control Reagent”.

13.5 Weryfikacja testu

Przed pierwszym zastosowaniem systemu barwienia w ramach procedury diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować jakość testu. W tym celu należy wykonać testy z użyciem serii tkanek zapewnianych przez laboratorium o znanej charakterystyce odczynów IHC, odpowiadających tkankom o odczynie dodatnim i ujemnym. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z przedstawionymi powyżej procedurami kontroli jakości, jak również z wymogami kontroli jakości programu CAP Certification Program for Immunohistochemistry and/or CLSI Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline¹⁸. Do weryfikacji testu nadają się tkanki raka sutka ze znanym odczynem w kierunku HER2 wynoszącym od 0 do 3+, a także tkanki do kontroli ujemnej (Tabela 4). Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać każdorazowo w przypadku zmiany parametrów testu. W tabeli 10 przedstawiono opcje rozwiązywania potencjalnych problemów, ich przyczyny oraz sugerowane działania korygujące.

14. Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali

Wykrywanie nadekspresji białka HER2 powinno odbywać się wyłącznie w oparciu o nasilenie odczynu *błonowego*, który należy oceniać na podstawie skali przedstawionej w Tabeli 1. Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu jasnego pola. Do oceny punktowej odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10x. Zastosowanie obiektywu o powiększeniu 20–40x jest zalecane w celu potwierdzenia wyniku. Odczyn cytoplazmatyczny należy uznać za nieswoisty i nie należy go brać pod uwagę przy ocenie nasilenia odczynu błonowego.³ W rozróżnianiu poziomów nasilenia 0, 1+, 2+ i 3+ pomocny jest dokument „HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) Interpretation Manual – Breast Cancer” (Instrukcja interpretacji wyników testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) – rak sutka). Zawarto w nim również reprezentatywne przykłady nasilenia odczynów. Dodatkowe zalecenia dotyczące interpretacji wyników testu HercepTest™ mAb pharmDx zamieszczone w części 15.2.

Oceniać należy wyłącznie próbki pochodzące od pacjentów z inwazyjnym rakiem sutka. Jeśli w jednej próbce występują jednocześnie komórki raka *in situ* oraz inwazyjnego, należy oceniać wyłącznie składnik inwazyjny.

Tabela 1. Kryteria oceny nasilenia odczynu błonowego

Charakter odczynu	Wynik (przekazywany lekarzowi prowadzącemu leczenie)	Ocena nadekspresji białka HER2 (przekazywana lekarzowi prowadzącemu leczenie)
Brak odczynu lub odczyn błonowy obserwowany w mniej niż 10% komórek guza.	0	Ujemna
Błady / ledwie rozpoznawalny odczyn błonowy w więcej niż 10% komórek guza. Wybarwione są tylko fragmenty błon poszczególnych komórek.	1+	Ujemna
Słaby do umiarkowanego całkowity odczyn błonowy w więcej niż 10% komórek guza.	2+	Słabo dodatnia
Silny całkowity odczyn błonowy w więcej niż 10% komórek guza.	3+	Silnie dodatnia

Wynik testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) w kierunku nadekspresji białka HER2 interpretuje się jako ujemny (nasilenie odczynu 0 i 1+), słabo dodatni (nasilenie odczynu 2+) albo silnie dodatni (nasilenie odczynu 3+). Test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) nie jest przeznaczony do dostarczania informacji prognostycznych pacjentowi i lekarzowi i nie został zatwierdzony do tego celu.

15. Ocena tkanki

Podczas każdej procedury barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej poniżej w celu ustalenia ważności procedury barwienia i umożliwienia półilościowej oceny nasilenia odczynu tkanki pochodzącej od pacjenta. Szczegółowe informacje zamieszczone w Tabeli 2.

1. Barwienie próbek tkankowych z użyciem hematoksyliny i eozyny (metoda H&E)
2. Preparat kontrolny zawierający cztery linie komórkowe – **włączany wyłącznie do pierwszej serii barwienia po załadowaniu lub ponownym załadowaniu o urządzenia Dako Omnis odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciała pierwotne i odczynnik do wizualizacji).**
3. Tkankowa kontrola dodatnia
4. Tkankowa kontrola ujemna
5. Tkanka pacjenta wybarwiona z użyciem odczynnika Negative Control Reagent (**opcjonalnie**)
6. Tkanka pacjenta wybarwiona z użyciem przeciwciała pierwotnego (HercepTest™ mAb pharmDx Rabbit Anti-Human HER2 (Dako Omnis))

Tabela 2: Zalecana kolejność oceny tkanek

Próbki	Uzasadnienie	Wymagania dotyczące oceny
1. Tkanka pacjenta wybarwiona metodą H&E	W pierwszej kolejności oceniana jest tkanka pacjenta wybarwiona metodą H&E w celu określenia histologii tkanki oraz jakości jej utrwalenia.	<ul style="list-style-type: none"> Test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) i barwienie metodą H&E należy przeprowadzić na kolejnych skrawkach pochodzących z tego samego bloczka parafinowego próbki. Próbki tkanek powinny być nienaruszone i dobrze utrwalone, a także odpowiadać rozpoznanemu typowi histologicznemu guza.
2. Preparat kontrolny (Dostarczony z zestawem)	Preparat kontrolny należy poddać ocenie w celu weryfikacji prawidłowego działania odczynników z ograniczeniem partii. Patrz rozdział 15.1, Ocena preparatu kontrolnego .	<ul style="list-style-type: none"> Preparat kontrolny należy włączyć wyłącznie do pierwszej serii barwienia po załadowaniu lub ponownym załadowaniu do urządzenia Dako Omnis odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciała pierwotne i odczynnik do wizualizacji).
3. Tkankowa kontrola dodatnia (zapewniane przez laboratorium)	Następnie należy poddać ocenie tkankę kontrolną o słabo dodatnim odczynie (2+). Kontrola ta weryfikuje metodę utrwalania, techniki barwienia i działanie odczynników.	<ul style="list-style-type: none"> Do interpretacji wyników barwienia należy wybierać jedynie komórki prawidłowe, gdyż w komórkach martwiczych lub uszkodzonych często występują odczyny nieswoiste¹⁹. Tkanka guza powinna wykazywać brązowy odczyn błonowy. Nasilenie odczynu cytoplazmatycznego i struktur ujemnych w próbce nie powinno przekraczać wartości 1+. Jeżeli w tkankowej kontroli dodatniej nie uzyskano wystarczającego odczynu dodatniego, należy uznać, że wyniki uzyskane na tkankach pacjenta są nieważne.
4. Tkankowa kontrola ujemna (zapewniane przez laboratorium)	Tkankę do kontroli ujemnej należy poddać ocenie po tkance do kontroli dodatniej, aby zweryfikować swoistość znakowania antygeny docelowego przez przeciwciała pierwotne.	<ul style="list-style-type: none"> Brak odczynu błonowego w tkance do kontroli ujemnej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciała z komórkami/składnikami komórek. W charakterze tkanki do kontroli ujemnej można również wykorzystać fragmenty dodatniej próby kontrolnej wykazujące odczyn ujemny, jednak w takim przypadku wymagana jest weryfikacja przeprowadzona przez użytkownika. Bardzo słaba reakcja może być obserwowana w przypadku większości prawidłowych tkanek nabłonka.^{3, 20, 21} Potencjalne tkanki do kontroli ujemnej zamieszczono w Tabeli 4. Jeśli występuje odczyn nieswoisty, ma on charakter rozlany. W preparatach tkanek poddawanych nadmiernemu utrwalaniu w formalinie może niekiedy występować odczyn w obrębie tkanki łącznej. Jeżeli tkanka do kontroli ujemnej wykazuje odczyn swoisty (fałszywy odczyn dodatni), wyniki tkanki pacjenta należy uznać za nieważne.
5. Opcjonalnie: tkanka pacjenta wybarwiona z użyciem odczynnika Negative Control Reagent (zapewniane przez laboratorium)	Brak odczynu błonowego potwierdza swoistość znakowania antygeny docelowego przez przeciwciała pierwotne.	<ul style="list-style-type: none"> Brązowy odczyn występujący w cytoplazmie komórek próbek barwionych z użyciem odczynnika Negative Control Reagent, np. w tkance łącznej, leukocytach, erytrocytach lub komórkach martwiczych, należy uznać za nieswoisty odczyn tła.
6. Tkanka pochodząca od pacjenta. (zapewniane przez laboratorium)	W celu oceny statusu ekspresji białka HER2 należy jako ostatnie poddać ocenie próbki wybarwione z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis). Szczegółowe informacje na temat oceny tkanek pacjenta zamieszczono w rozdziale 14 .	<ul style="list-style-type: none"> Podobnie jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że nie wykryto antygeny, co nie znaczy, że nie był on obecny w analizowanych komórkach/tkankach. Szczegółowe informacje dotyczące immunoreaktywności testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) zawierają części Streszczenie i informacje ogólne, Ograniczenia i Charakterystyka działania. W przypadku uzyskania niejednoznacznych / słabo dodatnich wyników zalecana jest automatyczna diagnostyka referencyjna zgodnie z wytycznymi ASCO/CAP.²²

15.1 Ocena preparatu kontrolnego (w zestawie)

Preparat kontrolny (z kontrolnymi liniami komórkowymi) wybarwiony z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) należy poddać ocenie w celu weryfikacji prawidłowego działania odczynników z ograniczeniem partii (przeciwciała pierwotne i odczynnik do wizualizacji) po ich załadowaniu lub ponownym załadowaniu do urządzenia Dako Omnis. Obecność brązowego odczynu na błonach komórkowych świadczy o reaktywności dodatniej.

Należy zweryfikować stopniowy wzrost nasilenia odczynu czterech kontrolnych linii komórkowych, od braku ekspresji HER2 (brak odczynu, odczyn ujemny) do wysokiej ekspresji HER2 (odczyn o dużym nasileniu). Następnie linie kontrolne należy osobno poddać ocenie, jak przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3: Charakter odczynu preparatów kontrolnych HercepTest™ mAb pharmDx Control Slides (Dako Omnis)

Nasilenie odczynu	Poziom ekspresji białka HER2
Brak odczynu	Odczyn ujemny. Brak ekspresji białka HER2
Częściowy brązowy odczyn błonowy o nasileniu słabym do umiarkowanego*	Niska ekspresja białka HER2
Całkowity brązowy odczyn błonowy o nasileniu umiarkowanym do dużego*	Umiarkowana ekspresja białka HER2
Całkowity brązowy odczyn błonowy o dużym nasileniu	Wysoka ekspresja białka HER2

*W linii kontrolnej z niską ekspresją można obserwować pewne odchylenia w zakresie charakteru odczynu: 1) Punktowy odczyn immunohistochemiczny cytoplazmy obszaru aparatu Golgiego. 2) Obecność kilku komórek z całkowitym odczynem błonowym.

Jeżeli którakolwiek z kontrolnych linii komórkowych preparatu kontrolnego nie spełnia wymienionych kryteriów, odczynniki z ograniczeniem partii używane w serii barwienia powinny zostać odrzucone, a preparaty wybarwione tymi odczynnikiemami należy uznać za nieważne. Należy wyrzucić tylko preparaty wybarwione po załadowaniu / ponownym załadowaniu odczynników, które doprowadziły do nieprawidłowego wybarwienia preparatów kontrolnych Control Slides.

15.2 Dodatkowe zalecenia dotyczące interpretacji barwienia z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis)

W testach większości tkanek raka sutka badanych w kierunku nadekspresji 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 nastręczać trudności interpretacyjnych.

UWAGA: kontrast wizualny pomiędzy odczynnikiem DAB a hematoksyliną do barwienia kontrastowego może wpływać na postrzeganie nasilenia odczynu błonowego, dlatego ważne jest przestrzeganie zalecanych wytycznych dotyczących interpretacji. Reprezentatywne przykłady podano w dokumencie „HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) Interpretation Manual – Breast Cancer” (Instrukcja interpretacji wyników testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) – rak sutka).

Poniżej podano dodatkowe wskazówki dotyczące interpretacji odczynu uzyskanego z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis).

1. Najpierw należy ocenić tkanki pacjenta wybarwione w kierunku ekspresji białka HER2 przy małym powiększeniu (10x). Większość przypadków dodatków będzie ewidentnie rozpoznawalna przy małym powiększeniu.
2. Do ustalenia odsetka dodatnich komórek guza należy wykorzystać dobrze zachowane i dobrze wybarwione obszary próbki.
3. Aby zweryfikować obecność odczynu błonowego, należy użyć powiększenia 20–40x.
4. Jeśli w więcej niż 10% komórek guza występuje całkowity odczyn błonowy, to wynik wynosi 2+ lub 3+. Należy przejść do powiększenia 20–40x, aby potwierdzić wynik. W większości przypadków z wynikiem 3+ wybarwionych jest co najmniej 80% komórek guza, a odczyn błonowy jest silny i całkowity.
5. Jeśli odsetek dodatnich komórek guza w próbce jest bliski granicznej wartości 10%, zaleca się zliczenie co najmniej 100 komórek guza w celu określenia odsetka wybarwionych komórek.
6. Jeśli w więcej niż 10% komórek guza występuje słaby lub umiarkowany całkowity odczyn błonowy, to wynik dla próbki wynosi 2+. Zwykle towarzyszy mu częściowy odczyn błonowy większości pozostałych komórek guza.
7. Jeśli całkowity odczyn błonowy występuje w mniej niż 10% komórek guza, wynik wynosi 1+ pomimo tego, że inne komórki guza mogą wykazywać częściowy odczyn błonowy.
8. Jeśli całkowity lub częściowy odczyn błonowy występuje w mniej niż 10% komórek guza, wynik wynosi 0.

16. Ograniczenia

16.1 Ograniczenia ogólne

1. Technika immunohistochemiczna jest wieloetapową metodą diagnostyczną wymagającą specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, tkanek, sposobu utrwalania i obróbki, przygotowania preparatu immunohistochemicznego oraz interpretacji wyników barwienia.
2. Odczyn tkankowy zależy od przygotowania i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, dzielenie na skrawki lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub cieczami może powodować powstawanie artefaktów, blokowanie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą być spowodowane zmianami w zakresie metod utrwalania i zatapiania lub przez naturalne nieregularności w obrębie tkanek.
3. Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
4. Interpretacja kliniczna wystąpienia barwienia lub jego braku musi być prowadzona w kontekście objawów klinicznych, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna wystąpienia barwienia lub jego braku musi być uzupełniona o badania morfologiczne z wykorzystaniem odpowiednich prób kontrolnych i innych testów diagnostycznych. Odpowiedzialność za interpretację wybarwionych preparatów spoczywa na wykwalifikowanym patologu z doświadczeniem w zakresie stosowanych przeciwciał, odczynników i metod. Barwienie należy wykonać w certyfikowanym laboratorium pod nadzorem patologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów oraz właściwe wykonanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych.
5. Tkaniki pochodzące od osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać nieswoisty odczyn w reakcji z peroksydazą chrzanową²³.
6. W typach tkanek, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji, nawet w przetestowanych typach tkanek, z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworowych i innych tkankach patologicznych²⁴. W przypadku uzyskania nieoczekiwanych reakcji należy przesłać odpowiednią dokumentację do działu wsparcia histopatologicznego firmy Agilent.
7. Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Mogą one również wystąpić na skutek aktywności pseudoperoxydazy (erytrocyty) i endogennej peroksydazy (cytochrom C)¹⁷.
8. Odczynniki i instrukcje dostarczane z zestawem opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników. Dalsze rozcieńczenie odczynników bądź zmiana czasów lub temperatur inkubacji może prowadzić do uzyskania błędnych lub niezgodnych wyników.
9. Preparaty oznaczone w dzienniku preparatów stacji roboczej Dako Link Omnis powinny być sprawdzone przez wykwalifikowany personel. Patrz podstawowy i zaawansowany podręcznik użytkownika Dako Omnis.
10. Anulowanie preparatów oznacza, że podczas barwienia wystąpił poważny problem i nie należy ich stosować. Będzie wymagane ponowne barwienie próbki. Dalsze informacje zawiera zaawansowany podręcznik użytkownika Dako Omnis.

16.2 Ograniczenia swoiste dla opisywanego produktu

1. Antygen obecny w kontrolnej linii komórkowej z niską ekspresją białka HER2 z czasem ulega rozkładowi. Wyniki odczynu preparatu kontrolnego należy oceniać w kontekście daty ważności tego preparatu. Brak odczynu komórek kontrolnej linii komórkowej z niską ekspresją białka HER2 może jedynie wskazywać na rozkład antygenu preparatu kontrolnego.
2. Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygenu w tkankach. Próbki powinny zostać wybarwione zgodnie z zaleceniami dotyczącymi przechowywania skrawków (patrz rozdział 10, Przygotowanie próbek).
3. Nie zastępować odczynników zestawu: przeciwciała pierwotnego, odczynnika do wizualizacji i preparatów kontrolnych Control Slides odczynnikami o innych numerach partii.
4. Ocena odczynu cytoplazmatycznego może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników. W interpretacji należy brać pod uwagę wyłącznie nasilenie odczynu błonowego.
5. Wybarwione preparaty kontrolne Control Slides należy stosować wyłącznie w celu weryfikacji działania odczynników z ograniczeniem partii wyników serii odczynów, a *nie* jako wskaźnik w ocenie odczynu na skrawkach tkankowych.
6. Możliwe jest sporadyczne występowanie silnego (3+) odczynu ogniskowego. Zaleca się wykonanie barwienia immunohistochemicznego drugiego bloczka tkanki z tej samej próbki.
7. Stosowanie testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na próbkach utrwalonych w środkach innych niż obojętna buforowana formalina nie zostało zatwierdzone.
8. Dopuszczalny jest słaby odczyn prawidłowego nabłonka w tkance sutka. W razie zaobserwowania silnego odczynu prawidłowego nabłonka należy powtórzyć test.

17. Charakterystyka działania**17.1 Czulość analityczna**

Czulość analityczna testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) była badana na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach raka sutka z ekspresją białka HER2 wynoszącą 0–3+. Ocena ekspresji HER2 z użyciem serii rozcieńczeń przeciwciała pierwotnego wykazała korelację między stężeniem przeciwciała a nasileniem odczynu swoistego dla HER2.

17.2 Swoistość analityczna

Tkanki prawidłowe: w Tabeli 4 podsumowano immunoreaktywność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na zalecanym panelu tkanek prawidłowych wybarwionych zgodnie z instrukcjami zawartymi w tej ulotce. W błonach i cytoplazmie różnych komórek nabłonka obserwowano odczyn bardzo słaby lub prawie brak odczynu w kierunku białka HER2.

Tabela 4: Podsumowanie reaktywności testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) w komórkach prawidłowych. Procent (%) oznacza odsetek komórek dodatnich

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy; elementy tkankowe (nasilenie i % komórek)	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny; elementy tkankowe (nasilenie i % komórek)	Odczyn nieswoisty
Grasica (3)	2/3 Komórki retikulum i ciała Hassalla (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 50%)	0/3	0/3
Gruzoł krokowy (3)	2/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu do odczynu słabego/umiarkowanego, 20%)	0/3	0/3
Gruzoły sutkowe (3)	3/3 Komórki przewodowe (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–80%)	0/3	0/3
Jajniki (3)	1/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 40%)	0/3	0/3
Jądra (3)	0/3	0/3	0/3
Jelito cienkie (3)	3/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 2–50%)	3/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 2–50%)	0/3
Macica (3)	2/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10%)	0/3	0/3
Międzybłonek (3)	0/3	0/3	0/3
Mięśnie szkieletowe (3)	0/3	0/3	0/3
Migdałki (3)	3/3 Komórki nabłonka płaskiego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10–30%)	3/3 Komórki nabłonka płaskiego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10–30%)	0/3
Mózg (3)	0/3	0/3	0/3
Mózdzek (3)	0/3	0/3	0/3
Nadnercza (3)	0/3	0/3	0/3
Nerki (3)	3/3 Komórki nabłonka kanalików (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 2–10%)	3/3 Komórki nabłonka kanalików (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 2–10%)	0/3
Nerwy obwodowe (3)	0/3	1/3 Komórki nerwowe (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 1%)	0/3
Okrężnica (3)	3/3 Komórki nabłonka jelita grubego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu do odczynu słabego/umiarkowanego, 40–80%)	0/3	0/3
Płuca (3)	0/3	0/3	0/3
Przełyk (3)	1/3 Komórki nabłonka komorowego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10%)	0/3	0/3
	2/3 Komórki nabłonka płaskiego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 20%)	0/3	0/3
Przysadka (3)	0/3	0/3	0/3
Przytarczycy (3)	3/3 Komórki główne (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–40%)	0/3	0/3
Serce (3)	0/3	0/3	0/3
Skóra (3)	3/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 40–60%)	0/3	0/3

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy; elementy tkankowe (nasilenie i % komórek)	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny; elementy tkankowe (nasilenie i % komórek)	Odczyn nieswoisty
Szypik kostny (3)	0/3	1/3 Prekursory szpikowe (odczyn słaby do umiarkowanego, <1%)	0/3
Szyjka macicy (3)	3/3 Komórki nabłonka gruczołowego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–10%)	0/3	0/3
Śledziona (3)	0/3	0/3	0/3
Ślinianki (3)	0/3	1/3 Komórki nabłonkowe pęcherzyków, typ surowiczy (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10%)	0/3
		3/3 Komórki nabłonka przewodowego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10–50%)	
Tarczycy (3)	3/3 Komórki nabłonka pęcherzykowego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–30%)	0/3	0/3
Trzustka (3)	3/3 Komórki nabłonka przewodowego (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–10%)	0/3	0/3
Wątroba (3)	0/3	2/3 Hepatocyty (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 2–5%)	0/3
Żołądek (3)	3/3 Komórki nabłonka (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 10–30%)	0/3	0/3

Tkanki nieprawidłowe: w Tabeli 5 podsumowano immunoreaktywność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) na panelu tkanek nieprawidłowych wybarwionych zgodnie z instrukcjami zawartymi w tej ulotce.

Tabela 5: Podsumowanie reaktywności testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) w tkankach nieprawidłowych (nowotworowych). Procent (%) oznacza odsetek komórek dodatnich guza

Typ nowotworu (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy (nasilenie i % komórek)	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny (nasilenie i % komórek)	Odczyn nieswoisty
Rak sutka (3)	3/3 inwazyjny i in situ (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu do odczynu słabego/umiarkowanego, 20–100%)	0/3	0/3
Rakowiak (3)	1/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 40%)	0/3	0/3
Rak jelita grubego (3)	3/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–30%)	0/3	0/3
Rak wątrobowokomórkowy (3)	0/3	0/3	0/3
Mięśniak gładkokomórkowy (3)	0/3	0/3	0/3
Rak płuca (3)	3/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu do odczynu słabego/umiarkowanego, 5–40%)	0/3	0/3
Chłoniak (3)	0/3	0/3	0/3
Czerniak (3)	0/3	0/3	0/3
Rak jajnika (3)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 20–30%)	0/3	0/3
Rak trzustki (3)	1/3 (odczyn słaby do umiarkowanego, 50%)	0/3	0/3
Rak gruczołu krokowego (3)	3/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 20–40%)	0/3	0/3
Rak z komórek nerkowych (3)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 20%)	0/3	0/3
Mięsak (3)	0/3	0/3	0/3
Rak żołądka (3)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–15%)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, 5–15%)	0/3
Rak trzustki (3)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, <1–2%)	2/3 (odczyn bardzo słaby / prawie brak odczynu, <1–2%)	0/3
Rak niezróżnicowany (3)	0/3	0/3	0/3

17.3 Dokładność

Dokładność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) była oceniana w jednym wewnętrznym i trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Uzyskane dane przedstawiono w tabelach 6 i 7. Średnią zgodność wyników dodatnich (ang. average positive agreement, APA), średnią zgodność wyników ujemnych (ang. average negative agreement, ANA) oraz zgodność wszystkich wyników (ang. overall agreement, OPA) obliczono z wykorzystaniem 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej. Dla badań, w których uzyskano 100% zgodności, określono przedziały ufności z użyciem metody Wilsona oraz skorygowaną wielkość próbki, aby uwzględnić korelację pomiędzy porównaniami w obrębie próbki.

Tabela 6: Dokładność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) badana w jednym ośrodku wewnętrznym

Badanie dokładności	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami	Każda z 60 próbek raka sutka (30 próbek niewykazujących ekspresji HER2 i 30 próbek wykazujących ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 została zbadana w trzech powtórzeniach w każdym z trzech urządzeń Dako Omnis. Odtwarzalność pomiędzy urządzeniami została określona na podstawie łącznie 180 porównań parami.	APA 100% (94,0-100,0%) ANA 100% (94,0-100,0%)

Badanie dokładności	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy partiami	Każda z 24 próbek (12 próbek niewykazujących ekspresji HER2 i 12 próbek wykazujących ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 IHC została zbadana z użyciem trzech partii zestawów i trzech partii komponentów zamiennych w urządzeniu Dako Omnis. Odtwarzalność pomiędzy partiami została określona na podstawie łącznie 216 porównań parami.	APA 97,3% (97,3-98,2%) ANA 97,1% (97,1-98,1%)
W obrębie serii	Każda z 48 próbek raka sutka (24 próbki niewykazujące ekspresji HER2 i 24 próbki wykazujące ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Dako Omnis. Seria została zdefiniowana jako nieprzerwana seria odczynów wykonana w ciągu 24 godzin. Odtwarzalność w obrębie serii została określona na podstawie łącznie 480 porównań parami.	OPA 100% (98,0-100,0%)

APA = średnia zgodność wyników dodatnich; ANA = średnia zgodność wyników ujemnych; OPA = zgodność wszystkich wyników

Tabela 7: Dokładność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) badana w trzech ośrodkach zewnętrznych

Badanie dokładności	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy laboratoriami	Każda z 40 próbek raka sutka (20 próbek niewykazujących ekspresji HER2 i 20 próbek wykazujących ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza pomiędzy laboratoriami została przeprowadzona pomiędzy trzema laboratoriami w oparciu o łącznie 75 porównań parami na próbce.	APA 95,0% (93,6-95,8%) ANA 95,2% (94,1-95,9%)
Pomiędzy obserwatorami	Każda z 40 próbek raka sutka z badania pomiędzy laboratoriami (20 próbek niewykazujących ekspresji HER2 i 20 próbek wykazujących ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni. Analiza pomiędzy obserwatorami została przeprowadzona w oparciu o łącznie 75 porównań parami na próbce pomiędzy trzema laboratoriami.	APA : 95,1% (93,7-95,9%) ANA : 95,3% (94,0-95,9%)
Pomiędzy dniami/seriami (w obrębie laboratorium), w obrębie obserwatora	Każda z 40 próbek raka sutka (20 próbek niewykazujących ekspresji HER2 i 20 próbek wykazujących ekspresję HER2) o różnych wartościach ekspresji HER2 IHC została zbadana w pięciu seriach odczynów w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Dako Omnis. Analiza w obrębie laboratorium /pomiędzy dniami i w obrębie obserwatora została przeprowadzona w oparciu o łącznie 30 porównań parami na próbce pomiędzy trzema laboratoriami.	APA 95,2% (94,3-95,6%) ANA 95,4% (94,7-95,7%)

APA = średnia zgodność wyników dodatnich; ANA = średnia zgodność wyników ujemnych

*Różnice wyników APA i ANA z uwagi na metodę statystyczną

18. Charakterystyka skuteczności klinicznej

Wszystkich pacjentów uczestniczących w badaniach klinicznych nad lekiem Herceptin® wybierano przy użyciu badanego testu immunocytochemicznego przeznaczanego do badań klinicznych (ang. clinical trial assay, CTA). Żadnego z uczestników tych badań nie wybrano na podstawie oryginalnego testu HercepTest™ lub HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis). Oryginalny test HercepTest™ porównano z testem CTA na niezależnym zestawie próbek i stwierdzono możliwą do przyjęcia zgodność wyników. Aktualny produkt – test HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) został opracowany i porównany z oryginalnym testem HercepTest™. Wszystkie porównania wykazały możliwą do przyjęcia zgodność wyników.

Świadczą o tym dane z porównania metod w częściach 18.1 i 18.2 dla testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) w porównaniu z oryginalnym testem HercepTest™ (SK001) i testem HER2 IQFISH pharmDx (K5731). Nie ustalono jednak faktycznej korelacji między wynikami testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) a wynikami klinicznymi stosowania leku Herceptin®.

18.1 Ocena skuteczności, porównanie metod IHC

Oceniono skuteczność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) w porównaniu z testem HercepTest™ for Automated Link Platforms (SK001). Procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OPA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody Wilsona.

Tabela 8: Badanie porównawcze metod dotyczące skuteczności testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) w porównaniu z testem HercepTest™ for Automated Link Platforms (SK001)

Badanie porównawcze metod	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Porównanie metod IHC	458 próbek raka sutka o różnych poziomach ekspresji HER2 zostało wybarwionych z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) i testu HercepTest™ for Automated Link Platform (SK001) w ramach analizy porównawczej.	PPA: 93,3% (89,2-95,9%) NPA: 98,3% (95,7-99,3%) OPA: 94,5% (92,1-96,3%)

PPA = Procentowa zgodność wyników dodatnich; NPA = Procentowa zgodność wyników ujemnych; OPA = Procentowa zgodność wszystkich wyników

18.2 Ocena skuteczności, porównanie metody IHC z metodą FISH

Oceniono skuteczność testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) w porównaniu z testem HER2 IQFISH pharmDx (K5731). Procentową zgodność wyników ujemnych (NPA) i procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody Wilsona.

Tabela 9: Badanie porównawcze metod dotyczące skuteczności testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) w porównaniu z testem HER2 IQFISH pharmDx (K5731)

Badanie porównawcze metod	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Porównanie metody IHC z metodą FISH	422 próbki raka sutka o różnych poziomach ekspresji HER2 zostały wybarwione z użyciem testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (GE001) i testu HER2 IQFISH pharmDx (K5731) w ramach analizy porównawczej.	PPA: 93,1% (87,0-96,5%) NPA: 98,2% (95,4-99,3%)

NPA = Procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = Procentowa zgodność wyników dodatnich

19. Rozwiązywanie problemów

Informacje na temat środków zaradczych można znaleźć w części dotyczącej rozwiązywania problemów w poradniku szkoleniowym firmy Dako: Immunohistochemical Staining Methods (Metody barwienia immunohistochemicznego)¹⁷. Aby zgłosić nietypowy odczyn, należy skontaktować się z działem wsparcia histopatologicznego firmy Agilent.

Dako Omnis to zautomatyzowany system, który ostrzega użytkownika, jeśli jakikolwiek parametr w serii jest niezgodny ze specyfikacjami. Szczegółowe informacje zawierają podstawowy i zaawansowany podręcznik użytkownika Dako Omnis. Poniżej zamieszczono poradnik dotyczący rozwiązywania problemów w przypadku wyników i warunków, które mogą nie być wykrywane przez system ostrzegawczy i alarmowy urządzenia Dako Omnis. Informacje dotyczące rozwiązywania problemów związanych z komponentami z ograniczeniem partii testu HercepTest™ mAb pharmDx (Dako Omnis) (przeciwciała pierwotne, odczynnik do wizualizacji i preparaty kontrolne Control Slides) zawiera podstawowy podręcznik użytkownika Dako Omnis.

Użytkownik powinien zapewnić przestrzeganie harmonogramu konserwacji urządzenia Dako Omnis. Należy zawsze stosować odpowiednie kontrole, jak opisano w części „Kontrola jakości”.

Rozdział 10: Rozwiązywanie problemów

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak odczynu na preparatach lub odczyn o słabym nasileniu	1a. Wybrano nieprawidłowy protokół i odczynniki.	1a. Sprawdzić historię preparatów w celu zweryfikowania, czy wybrano właściwy protokół.
	1b. Nadmierne ogrzewanie zatopionych skrawków tkankowych przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis może prowadzić do utraty immunoreaktywności i morfologii.	1b. Skrawki tkankowe należy suszyć w temperaturze 60°C przez maksymalnie jedną godzinę. Suszenie skrawków tkankowych w podwyższonej temperaturze można przeprowadzać wyłącznie w skalibrowanym piecu suszącym z równomiernym rozkładem ciepła ¹⁵ .
	1c. Nieprawidłowe warunki przechowywania odczynników lub skrawków tkankowych.	1c. Należy upewnić się, że odczynniki były przechowywane prawidłowo, w warunkach odpowiadających wymienionym. Upewnić się, że skrawki tkankowe są przechowywane zgodnie z zaleceniami dotyczącymi ich przechowywania (Rozdział 10).
	1d. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	1d. Należy upewnić się, że tkanka pacjenta nie była utrwalana zbyt krótko lub zbyt długo, bądź nie użyto innego środka utrwalającego.
	1e. Odczynnik użyto po upływie jego daty ważności.	1e. Nie używać odczynnika po upływie jego daty ważności.
	1f. Odczynnik użyto po upływie terminu stabilności w urządzeniu.	1f. Nie używać odczynnika po upływie jego terminu stabilności w urządzeniu.
	1g. Nieprawidłowe umieszczenie pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu w modułach barwienia.	1g. Sprawdzić umieszczenie pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu.
	1h. Uszkodzone pokrywy o zmiennym położeniu względem preparatu.	1h. Sprawdzić integralność pokryw o zmiennym położeniu względem preparatu.
	1i. Do rozcieńczenia stężonego roztworu Target Retrieval Solution nie używa się wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej).	1i. Do przygotowania roztworu 1x Target Retrieval Solution należy użyć wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej). Należy pamiętać, że nie wszystkie źródła wody destylowanej lub dejonizowanej mają jakość/czystość odpowiednią do przygotowania odczynników IHC. Do przygotowania odczynników firma Agilent zaleca stosowanie wody o jakości odpowiedniej dla odczynników: wody destylowanej lub dejonizowanej, bądź wody o porównywalnej czystości.
	1j. Używany jest niewłaściwy roztwór Target Retrieval Solution.	1j. Należy używać właściwego roztworu Target Retrieval Solution określonego w częściach „Dostarczane materiały”, „Zamienniki dla komponentów zestawu” i/lub „Przygotowanie odczynników”.
2. Niezatwierdzone barwienie tkankowej kontroli dodatniej lub preparatu kontrolnego	2a. Rozkład antygenu preparatu kontrolnego lub odczynników, bądź obecność artefaktów.	2a. Ponownie wybarwić tkankową kontrolę dodatnią / preparat kontrolny w celu potwierdzenia wyników. Sprawdzić, czy odczynniki, w tym preparaty kontrolne Control Slides, i tkankowa kontrola dodatnia były przechowywane prawidłowo, zgodnie z podanymi warunkami przechowywania. Upewnić się, że nie minęła data ważności używanych preparatów kontrolnych. Upewnić się, że preparaty kontrolne Control Slides mają taki sam numer partii, co przeciwciała pierwotne i odczynnik do wizualizacji.
3. Nadmierny odczyn tła preparatów	3a. Podczas osadzania skrawków na szkiełkach dodano skrobię.	3a. Unikać stosowania dodatków zawierających skrobię, zwiększających przyczepność skrawków do szkiełek mikroskopowych. Wiele dodatków wykazuje immunoreaktywność.
	3b. Skrawki wyschły po procedurze barwienia w urządzeniu Dako Omnis.	3b. Sprawdzić, czy stacja wyładowywania jest napełniona wystarczającą ilością wody.
	3c. Doszło do wyschnięcia skrawków przed nałożeniem szkiełek nakrywkowych.	3c. Nie można dopuścić do wyschnięcia wybarwionych preparatów pomiędzy wyładowaniem z urządzenia Dako Omnis i nałożeniem szkiełek nakrywkowych.
	3d. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	3d. Upewnić się, że użyto właściwego utrwalacza. Alternatywne utrwalacze mogą wywoływać nadmierny odczyn tła.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
	3e. Niecałkowicie usunięta parafina.	3e. Sprawdzić wygląd złącza rozpuszczalnika. Delikatnie wyczyścić złącza, aby usunąć zanieczyszczenia. Po zakończeniu czyszczenia należy sprawdzić integralność złączy znajdujących się z tyłu butelki. Szczegółowe informacje zawiera podstawowy podręcznik użytkownika Dako Omnis.
	3f. Nieswoiste wiązanie odczynników do tkanki.	3f. Używać właściwej metody utrwalania próbek, aby uniknąć dużych obszarów martwicy tkanek.
	3g. Ponowne użycie paska do mieszania.	3g. Używać nowych pasków do mieszania.
4. Tkanki oddzielone od szkiełek	4a. Zastosowano niewłaściwe szkiełka mikroskopowe.	4a. Stosować szkiełka FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus.
5. Nadmiernie silny odczyn swoisty.	5a. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	5a. Upewnić się, że stosowane są wyłącznie zatwierdzone środki utrwalające i metody utrwalania.
	5b. Do rozcieńczenia stężonego roztworu Target Retrieval Solution nie używa się wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej).	5b. Do przygotowania roztworu 1x Target Retrieval Solution należy użyć wody o jakości odpowiedniej dla odczynników (destylowanej lub dejonizowanej). Należy pamiętać, że nie wszystkie źródła wody destylowanej lub dejonizowanej mają jakość/czystość odpowiednią do przygotowania odczynników IHC. Do przygotowania odczynników firma Agilent zaleca stosowanie wody o jakości odpowiedniej dla odczynników: wody destylowanej lub dejonizowanej, bądź wody o porównywalnej czystości.
6. Roztwór Target Retrieval Solution (koncentrat lub roztwór roboczy) wygląda na mętny przed załadowaniem do urządzenia Dako Omnis	6a. Roztwór był nieprawidłowo przechowywany lub minęła jego data ważności.	6a. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu podane na zewnętrznej części opakowania. Wyrzucić roztwór Target Retrieval Solution.
7. Preparat jest oznaczony	7a. Odczynnik użyto po upływie jego daty ważności.	7a-c. Oznaczone preparaty powinny być oceniane przez wykwalifikowany personel. Jeśli konieczne jest podjęcie dalszych działań, należy skontaktować się z firmą Dako.
	7b. Minął termin stabilności w urządzeniu odczynnika z ograniczeniem partii znajdującego się w urządzeniu Dako Omnis.	
	7c. Minął termin konserwacji lub wystąpiły inne czynniki.	







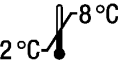





UWAGA: jeśli problemu nie daje się wyjaśnić żadną z powyższych przyczyn bądź zalecane działanie korekcyjne jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia histopatologicznego firmy Agilent w celu uzyskania dalszej pomocy. Dodatkowe informacje na temat technik wykonywania odczynów i przygotowywania próbek można znaleźć w poradniku szkoleniowym firmy Dako: Immunohistochemical Staining Methods (Metody barwienia immunohistochemicznego)¹⁷ (dostępny na stronie www.agilent.com), atlasie Atlas of Immunohistology²⁵ and Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis²⁶.

20. Piśmiennictwo

- Coussens, L.; Yang-Feng, T. L.; Liao, Y. C.; Chen, E.; Gray, A.; McGrath, J.; Seeburg, P. H.; Libermann, T. A.; Schlessinger, J.; Francke, U.; et al., Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985, 230 (4730), 1132-9.
- Schechter, A. L.; Hung, M. C.; Vaidyanathan, L.; Weinberg, R. A.; Yang-Feng, T. L.; Francke, U.; Ullrich, A.; Coussens, L., The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985, 229 (4717), 976-8.
- Press, M. F.; Cordon-Cardo, C.; Slamon, D. J., Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990, 5 (7), 953-62.
- Lonardo, F.; Di Marco, E.; King, C. R.; Pierce, J. H.; Segatto, O.; Aaronson, S. A.; Di Fiore, P. P., The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *The New biologist* 1990, 2 (11), 992-1003.
- Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B.; Henner, D.; Wong, W. L.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E.; Shepard, H. M., Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89 (10), 4285-9.
- Hudziak, R. M.; Lewis, G. D.; Winget, M.; Fendly, B. M.; Shepard, H. M.; Ullrich, A., p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular and cellular biology* 1989, 9 (3), 1165-72.
- Lewis, G. D.; Figari, I.; Fendly, B.; Wong, W. L.; Carter, P.; Gorman, C.; Shepard, H. M., Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 1993, 37 (4), 255-63.
- Baselga, J.; Norton, L.; Albanell, J.; Kim, Y. M.; Mendelsohn, J., Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer research* 1998, 58 (13), 2825-31.
- Cameron, D.; Piccart-Gebhart, M. J.; Gelber, R. D.; Procter, M.; Goldhirsch, A.; de Azambuja, E.; Castro, G., Jr.; Untch, M.; Smith, I.; Gianni, L.; Baselga, J.; Al-Sakaff, N.; Lauer, S.; McFadden, E.; Leyland-Jones, B.; Bell, R.; Dowsett, M.; Jackisch, C., 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet (London, England)* 2017, 389 (10075), 1195-1205.
- Untch, M.; Loibl, S.; Bischoff, J.; Eidtmann, H.; Kaufmann, M.; Blohmer, J. U.; Hilfrich, J.; Strumberg, D.; Fasching, P. A.; Kreienberg, R.; Tesch, H.; Hanusch, C.; Gerber, B.; Rezai, M.; Jackisch, C.; Huober, J.; Kuhn, T.; Nekljudova, V.; von Minckwitz, G., Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 2012, 13 (2), 135-44.

11. Kaufman, B.; Mackey, J. R.; Clemens, M. R.; Bapsy, P. P.; Vaid, A.; Wardley, A.; Tjulandin, S.; Jahn, M.; Lehle, M.; Feyereislova, A.; Revil, C.; Jones, A., Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009, 27 (33), 5529-37.
12. Piccart-Gebhart, M. J.; Procter, M.; Leyland-Jones, B.; Goldhirsch, A.; Untch, M.; Smith, I.; Gianni, L.; Baselga, J.; Bell, R.; Jackisch, C.; Cameron, D.; Dowsett, M.; Barrios, C. H.; Steger, G.; Huang, C. S.; Andersson, M.; Inbar, M.; Lichinitser, M.; Lang, I.; Nitz, U.; Iwata, H.; Thomssen, C.; Lohrisch, C.; Suter, T. M.; Ruschoff, J.; Suto, T.; Greatorex, V.; Ward, C.; Straehle, C.; McFadden, E.; Dolci, M. S.; Gelber, R. D., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* 2005, 353 (16), 1659-72.
13. 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.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute, Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Third Edition. CLSI document M29-A3. 3rd ed.; 2005.
15. Lundgaard Hansen B, W. H., Moller K Excessive section drying of breast cancer tissue prior to deparaffinisation and antigen retrieval causes a loss in HER2 immunoreactivity, *Immunocytochemistry (UK NEQAS ICC and ISH)*; 2008; pp 119-22.
16. Kiernan, J. A., *Histological and histochemical methods: theory & practice*. New York: Pergamon Press: 1981.
17. Taylor, C. R.; Rudbeck, L., *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods*. 6th ed.; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark: 2013.
18. Hewitt, S. M.; Robinowitz, M.; Bogen, S. A.; Gown, A. M.; Kalra, K. L.; Otis, C. N.; Spaulding, B.; Taylor, C. R., *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline Second Edition*. CLSI document I/LA28-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
19. Nadji, M.; Morales, A. R., Immunoperoxidase: Part I. The Technique and Its Pitfalls. In *Laboratory Medicine*, 1983; Vol. 14(12), pp 767-771.
20. Bast, R. C., Jr.; Puzstai, L.; Kerns, B. J.; MacDonald, J. A.; Jordan, P.; Daly, L.; Boyer, C. M.; Mendelsohn, J.; Berchuck, A., Coexpression of the HER-2 gene product, p185HER-2, and epidermal growth factor receptor, p170EGF-R, on epithelial ovarian cancers and normal tissues. *Hybridoma* 1998, 17 (4), 313-21.
21. Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A.; Olsson, I.; Edlund, K.; Lundberg, E.; Navani, S.; Szigartyo, C. A.; Odeberg, J.; Djureinovic, D.; Takanen, J. O.; Hober, S.; Alm, T.; Edqvist, P. H.; Berling, H.; Tegel, H.; Mulder, J.; Rockberg, J.; Nilsson, P.; Schwenk, J. M.; Hamsten, M.; von Feilitzen, K.; Forsberg, M.; Persson, L.; Johansson, F.; Zwahlen, M.; von Heijne, G.; Nielsen, J.; Ponten, F., Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015, 347 (6220), 1260419.
22. Wolff, A. C.; Hammond, M. E.; Hicks, D. G.; Dowsett, M.; McShane, L. M.; Allison, K. H.; Allred, D. C.; Bartlett, J. M.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; Hanna, W.; Jenkins, R. B.; Mangu, P. B.; Paik, S.; Perez, E. A.; Press, M. F.; Spears, P. A.; Vance, G. H.; Viale, G.; Hayes, D. F., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013, 31 (31), 3997-4013.
23. Omata, M.; Liew, C. T.; Ashcavai, M.; Peters, R. L., Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1980, 73 (5), 626-32.
24. Herman, G. E.; Elfont, E. A., The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 1991, 66 (4), 194-9.
25. Tubbs RR, G. G., Petras RE. , *Specimen processing and quality assurance. Atlas of immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press: 1986; Vol. 16.
26. Nadji M, M. A., *Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis*. Press, C. A. S. C. P., Ed. Chicago, 1986.

21. Objaśnienia symboli

 REF	Numer katalogowy		Zawiera ilość wystarczającą do wykonania <n> testów
 IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		Produkt delikatny: przenosić z zachowaniem ostrożności
	Sprawdzić w instrukcji obsługi	 LOT	Numer partii
	Ograniczenie temperatury		Zużyć przed
	Przechowywać w ciemności		Producent
	Piktogram GHS (patrz część dot. środków ostrożności)		
 EC REP	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