



CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF	790-4324	 50
	790-4325	 250

IVD

URČENÉ POUŽITÍ

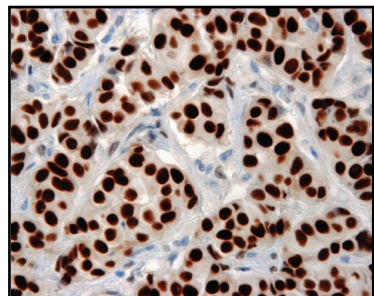


Figure 1. Barvení na protilátce CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) u lobulárního karcinomu prsu.

neoplastických buněk. Protilátka CONFIRM anti-ER (SP1) je určena jako pomůcka při léčbě, prognóze a predikci hormonální terapie karcinomu prsu.

Hodnocení musí provádět kvalifikovaný patolog, který přitom musí vzít v úvahu výsledky histologického vyšetření, příslušné klinické informace a patřičné kontroly.

Pouze na lékařský předpis.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

CONFIRM anti-ER (SP1) je králičí monoklonální protilátka, která rozpoznává lidský estrogenový receptor alfa. Syntetický peptid odpovídající C-terminální části molekuly estrogenového receptoru (ER) byl použit jako imunogen.¹ Bylo prokázáno, že CONFIRM anti-ER (SP1) reaguje s proteinem 66 kD z buněk MCF-7 při Western blottingu.¹ Velikost proteinu je v souladu s predikovanou velikostí z klonování genu pro ER.²

Králičí monoklonální protilátka prokázaly zlepšenou senzitivitu a specifitu při imunohistochemii.³ Jejich spolehlivost a kvalita barvení se dobře uplatňuje u případů karcinomu prsu.^{4,5} Velká studie 4 150 případů invazivních karcinomů prsu ukázala, že anti-ER klon SP1 byl lepší prognostický faktor než myši monoklonální klon 1D5.⁶ Dále ve studii využívající 1 198 vzorků invazivního karcinomu prsu byl SP1 více senzitivní při identifikaci exprese ER u nádorů než myši monoklonální klon 1D5 a 6F11.⁷ Klinické použití klonu anti-ER SP1 v kohortě 508 případů ukázalo podobnou senzitivitu, když bylo provedeno srovnání s myšimi monoklonálními protilátkami, ale s intenzivnějším jádrovým barvením s SP1.⁴ V jiné studii byla protilátka CONFIRM anti-ER (SP1) použita pro stanovení semikvantitativních hodnot hormonálního receptoru pomocí modifikovaného H-skóre založeného na procentu a intenzitě barvení. Následující kvantitativní měření ER receptorů pomocí RT-PCR u 80 případů karcinomů prsu dokazuje lineární shodu při porovnání s CONFIRM anti-ER (SP1).⁸

Národní institut zdraví (National Institutes of Health, NIH) v roce 1979 doporučil určovat stav ER pro všechny primární karcinomy prsu, aby mohla být lépe stanovena vhodná léčba. V roce 1985 NIH a Americká onkologická společnost (American Cancer Society) nezávisle na sobě publikovaly zprávy, které podporovaly určování hormonálního receptoru pro léčbu rakoviny prsu. V roce 2010 Americká společnost pro klinickou onkologii a Americká kolej patologů publikovaly *Doporučení pro imunohistochemické testování estrogenových a progesteronových receptorů u karcinomu prsu* a doporučily, že ER a PgR status musí být stanoveny u všech invazivních karcinomů prsu a recidiv karcinomu prsu.⁹ Používá se mnoho různých metod pro hodnocení stavu ER. FDA schválené terapie zahrnují test cytosolického receptoru (SBA/DCC) analyzovaného pomocí Scatchardovy metody (1981), histochemickou analýzu tkání pomocí fluorescenční mikroskopie, histochemickou analýzu zmrazené tkáně pomocí konjugátu potkaní monoklonální protilátky proti ER (1988), enzymovou imunanalýzu (EIA) také využívající konjugát potkaní monoklonální protilátky proti ER (1988).¹⁰ Imunohistochemická detekce ER byla popsána v kultivaci buněk lidského prsu,¹¹ některých tkáních lidského karcinomu

prsu,^{11,12} lidského endometria,¹³ některých endometriálních karcinomů,¹⁴ některých low grade endometriálních stromálních sarkomů,¹⁵ některých kultur endometriálních buněk,² některých nádorů potních žláz,¹⁶ některých tkáních benigních onemocnění štítné žlázy,¹⁷ některých karcinomů štítné žlázy,¹⁸ některých karcinomů žaludku,^{19,20} některých karcinomů prostaty²¹ a některých lidských močových měchýřů žen.²²

Společnost Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) hodnotila výsledky barvení s CONFIRM anti-ER (SP1) v normálních tkáních, neoplastických tkáních a u 198 případů karcinomu prsu. V 87 testovaných normálních tkáních byla exprese konzistentní s publikovanou literaturou, kde byl ER lokalizován na jádro a exprese byla omezena na reprodukční tkáň (prs, cervix, endometrium, prostata a děloha).²³

Rakovina prsu je nejběžnější karcinom vyskytující se u žen a představuje druhou nejčastější příčinu smrti spojenou s rakovinou.²⁴ Včasná detekce a vhodná léčba mohou výrazně zvýšit šance na přežití.^{25,26} Malé vzorky tkání mohou být snadno použity při běžné imunohistochemii, čímž se tato technika společně s protilátkou, jež dokáže rozpoznat antigeny důležité pro interpretaci karcinomu, stává efektivním nástrojem pro patologii při diagnóze a prognóze nemoci. Důležitým znakem pro rakovinu prsu je dnes estrogenový receptor, který váže estrogen s vysokou afinitou a specifitou. ER se nachází v cílových tkáňových buňkách, včetně prsu, kde působí jako stimulant různých biologických procesů spojených s estrogenem. Naopak snižování hladin krevního estrogenu snižuje biologickou aktivitu cílových buněk. Toto vytvořilo základ pro endokrinní terapii pro ženy s karcinomem prsu, které jsou ER pozitivní. Ke snížení hladin estrogenu se mohou také použít různé chirurgické přístupy, zahrnující ovariectomii, hypofysectomii a adrenalectomii.¹⁶

Vysoká koncentrace ER v prsním nádoru koreluje s větší odezvou na endokrinní terapii.¹⁸ Naopak, pokud by ER nebyl přítomen, bylo by třeba interpretovat tuto terapii jako nevhodnou. Znalost stavu ER hraje proto důležitou roli ve výběru léčby pro pacienta (ale není jediným základem pro výběr léčby).²⁵ V současné době se pro léčbu ER pozitivních karcinomů volí tamoxifen.^{25,26} Znalost ER stavu v prsních tumorech také pomáhá v prognóze a léčbě pacienta.²⁷ Řada studií ukázala, že přítomnost ER představuje příznivou dlouhodobou prognózu^{25,28,29,30} a specificky bylo prokázáno, že použití klonu SP1 má prognostický význam u pacientů, kteří podstoupili hormonální terapii.^{7,31} Pokud dojde k remisi, je třeba status ER znovu zhodnotit, protože se může po čase změnit.³²

Bylo také doporučeno, že zkouška na ER ve spojení s testy jiných biologických ukazatelů může být užitečná pro stanovení původu metastatické rakoviny prsu, zejména když je detekovaná v plicním a trávicím traktu.³³ Jiní výzkumní pracovníci však zjistili, že metastázy do lymfatických uzlin ne vždy udržovaly pozitivitu ER.³² Interpretace výsledků jakéhokoli detekčního systému pro ER musí brát do úvahy heterogenitu rakoviny prsu. Tumory zpravidla obsahují benigní epitelální buňky z normálních hyperplastických lobulů nebo kanálků, které jsou také ER pozitivní. Tyto testy využívající tkáňové homogenáty, jako jsou DCC nebo EIA, nemusí být pouhým odrazem stavu ER v maligní tkáni.³⁴ Histologické tkáňové preparáty mají výhodu intaktní tkáňové morfologie a tvoří tak pomůcku v interpretaci ER pozitivnosti vzorku. Všechny histologické testy musí být vyhodnocovány specialisty na morfologii nebo patologii rakoviny prsu a výsledky je třeba používat ve spojení s klinickými a laboratorními údaji.

DODÁVANÁ ČINIDLA

Katalogové číslo 790-4324

Protilátka CONFIRM anti-ER (SP1) obsahuje reagenty postačující pro 50 testů.

Jeden 5ml dávkovač CONFIRM anti-ER (SP1) obsahuje přibližně 5 µg králičí monoklonální protilátky nasměrované proti lidskému ER antigenu.

Katalogové číslo 790-4325

Protilátka CONFIRM anti-ER (SP1) obsahuje reagenty postačující pro 250 testů.

Jeden 25ml dávkovač CONFIRM anti-ER (SP1) obsahuje přibližně 25 µg králičí monoklonální protilátky nasměrované proti lidskému ER antigenu.

Protilátka je naředěna v 0,05 M Tris-HCl s obsahem 2% proteinového nosiče a 0,10% ProClin 300 konzervační látky. Obsahuje stopu (~0,2%) fetálního telecího séra vyrobeného v USA ze zásobního roztoku.

Celková proteinová koncentrace činidla je asi 20 mg/ml. Koncentrace specifické protilátky je asi 1 µg/ml. V tomto produktu není známa žádná nespecifická protilátková reaktivita.

CONFIRM anti-ER (SP1) je králičí monoklonální protilátka vyráběná jako supernatant buněčné kultury.

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvicí činidla, např. VENTANA detekční soupravy (tj. *ultraView* Universal DAB Detection Kit) a pomocné materiály, včetně kontrolních sklíček pro negativní a pozitivní tkáň, nejsou součástí dodávky.

UCHOVÁVÁNÍ

Uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C. Chraňte před mrazem.

Aby byl zajištěn správný účinek činidla a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve svislé poloze do chladničky.

Každý dávkovač s protilátkou má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane činidlo stabilní do data uvedeného na štítku. Nepoužívejte činidlo po uplynutí data expirace.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a barvicím automatem VENTANA BenchMark XT nebo VENTANA BenchMark ULTRA jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované ve formalínu a zalité v parafínu. Pro zpracování vzorků je doporučen následující postup:³⁵

1. Vložte vzorek do 10% neutrálního pufovaného formalínu. Použité množství by mělo odpovídat 15- až 20násobku tkáně. Fixativa neproniknou více než 2 až 3 mm do pevné tkáně nebo 5 mm do porézní tkáně v čase 24 hodin. Řez tkáně o tloušťce 3 mm nebo tenčí by měl být fixován minimálně 4 hodiny a maximálně 8 hodin. Fixace může být provedena při pokojové teplotě (15–25 °C).
2. Vzorek je po fixaci přes noc připraven v přístroji pro zpracování tkáně. Tento proces se ve zkratce skládá z dehydratace vzorku pomocí alkoholu, následované odstraněním činidel, aby byl odstraněn alkohol, a nakonec infiltrace parafínem.
3. Vzorky jsou zalaty parafínem v tkáňových kazetách a poté jsou vyříznuty přibližně 4 µm sekce, které jsou vycentrovány a vloženy na podložní sklíčko. Sklíčka by měla být Superfrost Plus nebo ekvivalentní. Tkáň musí být usušena na vzduchu ponecháním sklíčka při pokojové teplotě přes noc nebo vložením do sušičky na 60 °C po dobu 30 minut.

V zájmu zachování antigennosti nařezaných tkáňových řezy se musí řezy tkání barvit okamžitě.

Doporučuje se zpracovávat souběžně s neznámými vzorky též pozitivní a negativní kontrolní vzorky tkáně.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Tento produkt obsahuje 1% nebo méně bovinního séra, které se používá k výrobě této protilátky.
2. Zabráňte kontaktu činidel s očima a sliznicemi. Jestliže se reagentie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.
3. Zamezte mikrobiologické kontaminaci činidel.
4. ProClin 300 slouží jako konzervační látka v tomto roztoku. Tato látka je klasifikována jako dráždivá a při styku s pokožkou může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu činidel s očima, pokožkou a sliznicemi. Noste ochranný oděv a rukavice.
5. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a místních předpisech.
6. Další informace naleznete v bezpečnostních listech.

PRINCIP METODY

CONFIRM anti-ER (SP1) se váže na ER v parafínu zalitých řezech tkání. Specifická protilátka může být lokalizována buď formulací biotinem konjugované sekundární protilátky, která dokáže rozpoznat králičí imunoglobuliny, a následným přidáním konjugátu streptavidinu s křenuvou peroxidázou (HRP) *VIEW* DAB Detection Kit), nebo konjugátem sekundární HRP protilátky (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). Specifický komplex protilátky a enzymu je vizualizován reakcí se srážejícím se enzymem. Klinické případy by měly být hodnoceny v kontextu výsledku vhodných kontrol. Společnost Ventana doporučuje začlenit pozitivní kontrolní tkáň fixované a zpracované stejným způsobem jako vzorky pacientů (například slabě pozitivní karcinom prsu nebo dělohy). Kromě barvení protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) by mělo být obarveno ještě druhé sklíčko protilátkou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Aby test mohl být považován za platný, musí tkáň pro pozitivní kontrolu vykazat zabarvení jader nádorových buněk dělohy nebo děložních žláz a stromatu. Tyto komponenty musí být negativní, pokud jsou obarveny CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Navíc se doporučuje, aby sklíčko negativní kontroly tkáně (např. ER negativní karcinom prsu) bylo zahrnuto pro každou sérii vzorků zpracovávaných a probíhajících na barvicím automatu VENTANA. Tato negativní kontrolní tkáň by se měla barvit protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1), aby bylo zajištěno, že zesílení antigenu ani jiné postupy předběžné úpravy nevedly k falešně pozitivnímu obarvení.

Postup barvení

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty za účelem použití v barvicích automatech BenchMark XT nebo BenchMark ULTRA ve spojení s detekčními soupravami VENTANA a příslušenstvím. Doporučené barvicí protokoly jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Parametry automatických procedur lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v návodu k obsluze. Další podrobné informace o postupech imunohistochemického barvení naleznete v příbalovém letáku k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Navržené kontrolní testy a výsledky klinických studií dokazují ověření a validaci doporučených barvicích postupů pro jednotlivé detekční soupravy.

Jakákoliv změna doporučeného barvicího postupu ruší charakteristiky účinnosti popsané v příbalovém letáku. Uživatel je povinen ověřit jakékoliv změny doporučeného barvicího postupu.

Tabulce 1. Doporučený barvicí protokol pro CONFIRM anti-ER (SP1) za použití *ultraView* Universal DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Typ postupu	Přístroj/metoda	
	Přístroj BenchMark XT	Přístroj BenchMark ULTRA
Odstraňování parafínu	Zvolená	Zvolená
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, standardní	Cell Conditioning 1, standardní
Enzym (proteáza)	Není vyžadován	Není vyžadován
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
A/B blok (blokování biotinu)	Neuvádí se	Neuvádí se
Kontrastní barvivo (hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	Blauing, 4 minuty	Blauing, 4 minuty

Tabulce 2. Doporučené protokoly barvení pro CONFIRM anti-ER (SP1) s použitím detekční soupravy VIEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Typ postupu	Přístroj/metoda	
	Přístroj BenchMark XT	Přístroj BenchMark ULTRA
Odstraňování parafinu	Zvolená	Zvolená
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	Cell Conditioning 1, standardní	Cell Conditioning 1, standardní
Enzym (proleáza)	Není vyžadován	Není vyžadován
Protílátka (primární)	16 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
A/B blok (blokování biotinu)	Požadováno	Požadováno
Kontrastní barvivo (hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 minuty	Hematoxylin II, 4 minuty
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	Bluing, 4 minuty

Postup barvení na barvicích automatech VENTANA je následující. Další podrobné pokyny a další vlastnosti protokolu naleznete v návodu k obsluze.

BenchMark barvicí automaty IHC/ISH

- Opatřete sklíčka štítkem s čárovým kódem odpovídajícím protokolu protilátky, která má být zpracována.
- Založte primární protilátku a dávkovače příslušné detekční soupravy a potřebná přídavná činidla do zásobníku pro činidla a umístěte zásobník do barvicího automatu.
- Zkontrolujte nádoby na tekutiny a odpad.
- Do barvicího automatu vložte preparáty.
- Spustěte barvicí cyklus.
- Po dokončení cyklu vyjměte sklíčka z barvicího automatu.
- K odstranění krycího roztoku promyjte sklíčka v roztoku mírného saponátu na nádobí nebo alkoholu.
- Dehdujte, vyčistěte a zakryjte permanentním montovacím médiem.

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Tkáň pro pozitivní kontrolu

S každým provedeným barvicím postupem je třeba provést pozitivní kontrolu tkáně. Kolej amerických patologů doporučuje, aby byla na sklíčku pacienta pozitivní tkáňová kontrola.⁹ Příkladem tkáně pro použití jako pozitivní kontroly s protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) je slabě pozitivní karcinom prsu. Pozitivně zbarvené buňky nebo části tkáně (zbarvení jader nádorových buněk) se používají k potvrzení, že protilátka CONFIRM anti-ER (SP1) byla aplikována a že přístroj pracuje správně. Tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené buňky nebo části tkáně a slouží jako tkáň pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní vzorky musí být čerstvé vzorky z pitvy, biopsie nebo operace připravené nebo fixované co nejdříve a zalité stejným způsobem jako testované řezy. Takové tkáně mohou monitorovat všechny kroky postupu, od přípravy tkáně až po barvení. Použití tkáňového řezu fixovaného nebo zpracovaného jiným způsobem než testovaný vzorek zajistí kontrolu pro všechna činidla a kroky metody kromě fixace a zpracování tkáně.

Tkáň se slabým pozitivním zbarvením je pro optimální kontrolu kvality a pro rozpoznání nižší úrovně degradace činidel vhodnější než silně pozitivní zbarvení. Tkáň karcinomu prsu, o které je známo, že je slabě pozitivní, je ideální pro kontrolu a zjištění toho, zda je systém citlivý na malá množství degradace činidel nebo zda je problém v metodologii IHC.

Popřípadě může být pro pozitivní kontrolu použita normální lidská proliferující děložní sliznice. Součástí pozitivního obarvení je zbarvení jader glandulárních epitelů, stromálních buněk a buněk hladkého svalstva. Endometriální tkáň nemusí být ovšem zbarvena dost slabě na to, aby rozpoznala nízké množství degradace činidel nebo problémy s IHC metodologií.

Známé pozitivní kontroly tkání by měly být používány pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testových činidel, nikoliv jako pomůcka k formulaci specifické

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

Tkáň pro negativní kontrolu

Použijte kontrolní tkáň, která byla fixována, zpracována a zalita stejným způsobem jako vzorky pacienta, pro ověření specificity protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) při prokázání ER a pro zajištění indikace zbarvení pozadí (falešně pozitivní obarvení). Také rozmanitost různých druhů buněk ve většině tkáňových řežů může být použita jako vnitřní negativní kontrola pro ověření účinnosti CONFIRM anti-ER (SP1). Například pro negativní kontrolu lze použít stejnou tkáň (endometrium), která se používá pro pozitivní kontrolu. Části, které se nebarví (cytoplasma, buněčná membrána), by měly prokázat nepřítomnost specifického zbarvení u buněk, u kterých není zbarvení očekáváno, a zajistit indikaci zbarvení pozadí. Negativní kontrola tkáně by měla být také využita jako pomoc při interpretaci výsledků. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řežů tkání, často nabízí vnitřní oblasti pro negativní kontrolu, ale to by měl ověřit uživatel. Pokud části tkáně pro negativní kontrolu poskytnou specifické zbarvení, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Činidlo pro negativní kontrolu

K usnadnění interpretace výsledků je třeba provést pro každý vzorek cyklus s činidlem pro negativní kontrolu. Negativní kontrola je použita místo primární protilátky, aby se dalo vyhodnotit nespecifické zbarvení a mohlo být lépe interpretováno specifické zbarvení na místě antigenu. Tímto je zajištěna indikace nespecifického obarvení pozadí pro každé sklíčko. Místo primární protilátky zbarvíte sklíčko protilátkou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig, purifikovanou neimunní králíčí IgG nereagující s lidskými vzorky. Je-li pro negativní kontrolu použito jiné činidlo, je třeba je naředit ve stejném poměru jako antisérum primární protilátky ředicím roztokem Antibody Diluent. Asi 0,2% fetální telecí sérum je uchováno v CONFIRM anti-ER (SP1). Po přidání 0,2% fetálního telecího séra do roztoku Antibody Diluent je toto také vhodné pro použití jako negativní nespecifická reagenční kontrola. Inkubační doba činidla pro negativní kontrolu by měla odpovídat primární protilátce.

Pokud se panely řady protilátek používají se sériovými řezy, může činidlo pro negativní kontrolu na jednom podložním skle sloužit jako negativní kontrola nebo kontrola nespecifické vazby pozadí pro jiné protilátky.

Ověření testu

Před použitím této protilátky v diagnostickém procesu, nebo pokud došlo ke změně čísla šarže, měla by být ověřena specifita protilátky obarvením několika negativních a pozitivních tkání se známou účinností. Přečtěte si postupy kontroly kvality uvedené dříve v této části příbalové informace a doporučení pro kontrolu kvality akreditačního programu College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, dokument CLSI Approved Guideline nebo oba dokumenty.³⁶ Tyto postupy kontroly kvality je třeba zopakovat pro každou novou šarži protilátek nebo pokud dojde ke změně čísla šarže jednoho činidla v nesouhlasné sadě nebo ke změně parametrů testu. Kontrolu kvality nelze smysluplně provést na individuálním izolovaném činidle, jelikož spárovaná činidla, společně s definovaným testovacím protokolem, musí být testována současně před použitím soupravy pro účely diagnózy. K ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v části „Souhrn očekávaných výsledků“.

Všechny požadavky na kontrolu kvality musí odpovídat místním a národním předpisům či akreditačním požadavkům.

INTERPRETACE ZABARVENÍ

Při automatickém procesu imunohistochemického barvení VENTANA vzniká zbarvený reakční produkt, který se vysráží v místech s antigenem, nalezených pomocí CONFIRM anti-ER (SP1). Dříve než budou výsledky interpretovány, musí kvalifikovaný patolog mající zkušenosti s imunohistochemickými postupy vyhodnotit pozitivní a negativní kontroly a kvalitu barevných produktů. Stav estrogenového receptoru je určen procentem obarvených nádorových buněk. Případ je považován za ER pozitivní, pokud je zbarvení jader rovno nebo vyšší než 1% nádorových buněk. Je možné pozorovat specifické barvení stromatu a lymfocytů. Je nutné, aby při skórování těchto sklíčků bylo zvažováno pouze jaderné barvení v nádorových buňkách.

Tkáň pro pozitivní kontrolu

Nejprve je nutné provést test tkáně pro pozitivní kontrolu zbarvené CONFIRM anti-ER (SP1) a ověřit tak správnost funkce všech reagentů. Přítomnost hnědého (3,3' diaminobenzidintetrahydrochlorid, DAB) reakčního produktu uvnitř jader cílových buněk indikuje pozitivní reaktivitu. Příkladem tkáně pro pozitivní kontrolu je slabě pozitivní karcinom prsu, např. 3% z níž by jádérka nádorových buněk měla být pozitivní. Je také možné použít normální lidské endometrium. V normálním endometriu je vidět zbarvení ER v jádrech endometriálních žláz a stromatu. Pokud se u pozitivních kontrolních tkání neprojeví pozitivní zbarvení, je nutno považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno testovat po tkáni pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specifitu značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost zkrácené reaktivity s buňkami nebo částmi buněk. Pro negativní kontrolu lze použít tkáň karcinomu prsu, která se používá pro pozitivní kontrolu. Stromální prvky by neměly vykazovat obarvení jader. Pokud se projeví specifické zbarvení ve tkáni pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

Pokud se vyskytuje nespecifické zbarvení, je většinou difúzní. Sporadické slabé zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání nadměrně fixovaných formalinem. K interpretaci výsledků používejte pouze intaktní buňky, jelikož nekrotické nebo degenerované buňky mohou často barvit nespecificky.³⁸

Tkáň pacienta

Vzorky pacienta zbarvené pomocí CONFIRM anti-ER (SP1) se vyšetřují jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoliv nespecifického zbarvení pozadí činidla pro negativní kontrolu. ER je možné detekovat mezi dalšími nádory, jako jsou rakovina vaječnicků a endometria.¹³ Ke správné interpretaci jakéhokoliv imunohistochemického výsledku je třeba také pomoci řezů barvených hematoxylinem a ezinem zkoumat morfologii každého tkáňového vzorku. Pacientovy morfologické nálezy a příslušné klinické údaje musí interpretovat kvalifikovaný patolog. Specifické informace týkající se imunoreaktivity naleznete v částech „Souhrn a vysvětlení“ a „Souhrn očekávaných výsledků“.

OMEZENÍ

Všeobecná omezení

- Imunohistochemie (IHC) je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované školení ve výběru vhodných činidel a tkání, fixaci a zpracování, přípravě imunohistochemického podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
- Zbarvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, oplach, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, záchytu protilátky nebo k falešně negativním výsledkům. Následkem odchylek při fixaci a metodách zalévání či následkem stávajících nerovnoměrností ve tkáni může docházet k nekonzistentním výsledkům.
- Příliš silné nebo neúplné kontrastní barvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
- Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být vyhodnocena v kontextu klinického projevu, morfologie a jiných histopatologických kritérií. Klinickou interpretaci pozorovaného, nebo naopak nezjištěného zbarvení je vždy třeba doplnit morfologickým vyšetřením a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými testy. Tato protilátka je určena pro užití v panelu protilátek. Je odpovědností kvalifikovaného patologa, aby se seznámil s protilátkami, činidly a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skel a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Společnost Ventana dodává protilátky a činidla pro použití optimálně naředěné, pokud jsou dodrženy přiložené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může vést k tomu, že očekávané výsledky budou neplatné. Je nutno používat a dokumentovat příslušné kontroly. Uživatel, který se od doporučených postupů odchýlí, musí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků pacientů.
- Tento výrobek není určen pro průtokovou cytometrii, protože nebyly stanoveny charakteristiky účinnosti.
- U tkání, které nebyly předem testovány, mohou reagencie vykazovat neočekávané reakce. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmě nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí i v testovaných skupinách tkání.³⁸ S dokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní zastoupení společnosti Ventana.
- Tkáň osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen (HBsAg) hepatitidy B, mohou s křenuvou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení.³⁹
- Normální séra ze stejného živočišného zdroje jako sekundární antiséra použitá v blokovačích krocích mohou v důsledku přítomnosti autoprotilátek nebo přirozených protilátek způsobovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
- Falešně negativní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být také způsobeny aktivitou pseudoperoxidázy (erytrocyty) a aktivitou endogenní peroxidázy (cytochrom C)

nebo endogenním biotinem (příklad: játra, mozek, prs, ledvina) v závislosti na typu použitého imunohistochemického barviva.⁴⁰

- Jako u každého imunohistochemického testu znamená negativní výsledek, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen není v testovaných buňkách nebo tkáni přítomen.

Specifická omezení

- Protilátka ve spojení se detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA detekuje antigen, který přežívá v běžným způsobem zpracované a nařezané tkáni, fixované ve formalínu. Uživatelé, kteří nedodrží doporučené postupy, ponесou odpovědnost za interpretaci výsledků pacienta.
- Negativní výsledek protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) nevylučuje přítomnost ER. Negativní reakce v karcinomu prsu může být způsobena ztrátou nebo výrazným snížením exprese antigenu. Proto se doporučuje protilátku používat v panelu protilátek, včetně progesteronového receptoru.
- Tato protilátka není určena k použití při ručním barvení.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

- Imunoreaktivita protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) byla stanovena studií, jež ukázala příslušné barvení antigenu ER. 87 zkoumaných normálních tkání zahrnovalo: mozek, nadledvinu, vaječnik, slinivku, přišitná tělíska, hypofýzu, varlata, prs, slezina, tonsily, tymus, kostní dřeň, plíce, srdce, jícen, žaludek, střevo tenké, střevo tlusté, játra, slinné žlázy, ledviny, prostatu, cervix děložní, kůži, nerv, mezožel, endometrium, kosterní sval. Obarvení bylo jaderné, s pouze jedním případem nečekaného negativního zbarvení vaječnicku. Pozitivní nukleární zbarvení zahrnovalo lobulární a ductální buňky prstu, glandulární epitel a fibromuskulární buňky děložního hrdla nebo dělohy, glandulární epitel, tkáň stromatu a hladké svalové buňky endometria a buňky stromatu prostaty.

Ventana dále testovala celkem 51 neoplastických tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu pomocí CONFIRM anti-ER (SP1), s využitím stejných protokolů a předběžných postupů jako pro testování normální buněk. Zkoumané tkáně zahrnovaly neoplastické tkáně z následujících tkání: mozek, vaječnicku, slinivku břišní, varlata, štítná žláza, prs, slezina, plíce, jícen, žaludek, tenké střevo, tračník, rektum, játra, ledvina, prostata, děloha, děložní hrdlo, příčné pruhovaný sval, kůže, mediastinum, retroperitoneum, dutina břišní, močový měchýř, karcinom cervixu, lymfom. 1 ze 2 případů prostaty, 1 ze 3 případů dělohy a 1 ze 2 případů děložního hrdla byly na ER pozitivní.

Senzitivita závisí na zachování antigenu. Nesprávné zacházení s tkání během fixace, řezání, zalévání nebo skladování, které změní antigenicitu, oslabí detekci ER protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) a může tak způsobit falešně negativní výsledky.

- Šest jednotlivých případů tkání bylo obarveno jako součást testu reprodukovatelnosti. Z těchto šesti tkání měly dvě vysokou expresi ER, dvě nízkou expresi ER a dvě byly ER negativní na základě výřezu <1% nádorových buněk pro negativní, 1–10% pro nízkou a >10% pro vysokou expresi.

Při testu reprodukovatelnosti v rámci jednoho dne (uvnitř cyklu) bylo 9 sklíček z každého případu obarveno protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) a jedno sklíčko z každého případu bylo obarveno protilátkou Negative Rabbit Control Ig na přístroji BenchMark XT. Stejný testovací postup byl proveden také na přístroji BenchMark ULTRA. Opakovatelnost v rámci dne u protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark XT a BenchMark ULTRA byla 100% shodná na všech pozitivních tkáních mezi šesti případy. Sklíčka barvená protilátkou Negative Rabbit Control Ig byla přijatelná pro signál a pozadí.

V testu reprodukovatelnosti ze dne na den (mezi cykly) byla čtyři sklíčka z každého případu obarvena protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) a jedno sklíčko z každého případu bylo obarveno protilátkou CONFIRM Negative Control Rabbit Ig v pěti oddělených nenavazujících cyklech v průběhu 20 dnů na stejném přístroji BenchMark XT. Stejný testovací postup byl proveden také na přístroji BenchMark ULTRA. Opakovatelnost ze dne na den protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark XT a BenchMark ULTRA byla 100% shodná na všech pozitivních tkáních mezi šesti případy. Sklíčka barvená protilátkou Negative Rabbit Control Ig byla přijatelná pro signál a pozadí.

V testu uvnitř platformy na přístroji BenchMark XT byla 4 sklíčka z šesti případů obarvena protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) mezi třemi různými přístroji BenchMark XT. Jedno sklíčko z každého případu bylo obarveno protilátkou Negative Rabbit Control Ig. Reprodukovanost mezi přístroji protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) na třech přístrojích BenchMark XT byla 100% shodná u všech šesti případů. Sklíčka barvená protilátkou Negative Rabbit Control Ig byla přijatelná pro signál a pozadí.

V testu uvnitř platformy na přístroji BenchMark ULTRA byla 4 sklíčka z šesti případů obarvena protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) mezi třemi různými přístroji BenchMark ULTRA. Jedno sklíčko z každého případu bylo obarveno protilátkou Negative Rabbit Control Ig. Reprodukovatelnost mezi přístroji protilátky CONFIRM anti-ER (SP1) na třech přístrojích BenchMark ULTRA byla 100% shodná u všech šesti případů. Sklíčka barvená protilátkou Negative Rabbit Control Ig byla přijatelná pro signál a pozadí.

3. Srovnání přístroje BenchMark XT s přístrojem BenchMark ULTRA.

Randomizovaná, multicentrická studie s více hodnotiteli byla provedena za účelem srovnání barvení CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark ULTRA ve srovnání s přístrojem BenchMark XT. Přibližně 120 ER negativních a 132 ER pozitivních případů rakoviny prsu, představujících klinický rozsah testu, bylo náhodně přiřazeno na tři studijní pracoviště tak, aby každé pracoviště obdrželo stejný počet případů a každé pracoviště obdrželo případy představující každou klinickou testovanou kategorii. Každé pracoviště barvilo své přidělené případy protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark ULTRA a protilátkou CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark XT. Obarvená sklíčka byla vyhodnocena patologi, kteří určili procento obarvených nádorových buněk. Případ je považován za ER pozitivní, pokud jsou jádra zbarvena u alespoň 3 1% invazivních nádorových buněk.⁹

Tabulce 3. CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark ULTRA a CONFIRM anti-ER (SP1) na přístroji BenchMark XT.

Přístroj BenchMark XT	Přístroj BenchMark ULTRA		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	99	8	107
Negativní	11	91	102
Celkem	110	99	209
	n/N	% (95% IS)	
Pozitivní procentuální shoda	99/110	90,0 (83,0–94,3)	
Negativní procentuální shoda	91/99	91,9 (84,9–95,8)	
Celková procentuální shoda	190/209	90,9 (86,2–94,1)	

Hodnoty morfologické přijatelnosti pro všechna sklíčka této studie byly 100% (95% IS, 98,5% – 100%) na přístroji BenchMark ULTRA a 94,0% (95% IS, 90,4% – 96,4%) na přístroji BenchMark XT. Hodnoty přijatelnosti pozadí byly 94,8% (95% IS, 91,4% – 97,0%) na přístroji BenchMark ULTRA a 90,9% (95% IS, 86,7% – 93,8%) na přístroji BenchMark XT.

4. Porovnání MIEW DAB Detection Kit a *ultraView* Universal DAB Detection Kit pomocí CONFIRM anti-ER (SP1).

Protilátka CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody byla použita pro porovnání detekce mezi dvěma přístroji (BenchMark XT a BenchMark ULTRA) za použití MIEW DAB Detection Kit a *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Při testování bylo použito sto devadesát devět (199) případů tkání. Z hodnotitelných případů stanovených na přístroji BenchMark ULTRA bylo 111 pozitivních a 83 negativních jako funkce procenta barvených nádorových buněk. Obarvená sklíčka byla vyhodnocena patologi, kteří určili procento obarvených nádorových buněk. Případ je považován za ER pozitivní, pokud došlo k obarvení jádra u alespoň 1% nádorových buněk.

Jak u detekčních souprav, tak u přístrojů byly hodnoty pro morfologii i pozadí 100% přijatelné. Následující tabulky uvádějí přímé porovnání pozitivního a negativního klinického hodnocení mezi detekčními soupravami pro každý přístroj v Tabulce 4 pro přístroj BenchMark ULTRA a Tabulce 5 pro přístroj BenchMark XT.

Tabulce 4. Hodnocení pro *ultraView* Universal DAB Detection Kit proti MIEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	MIEW DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	108	3	111
Negativní	3	80	83
Celkem	111	83	194
	n/N	% (95% IS)	
Pozitivní procentuální shoda	108/111	97,3 (92,4–99,1)	
Negativní procentuální shoda	80/83	96,4 (89,9–98,8)	
Celková procentuální shoda	188/194	96,6 (93,4–98,6)	

Tabulce 5. Hodnocení pro *ultraView* Universal DAB Detection Kit proti MIEW DAB Detection Kit na přístroji BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	MIEW DAB Detection Kit		
	Pozitivní	Negativní	Celkem
Pozitivní	106	5	111
Negativní	2	79	81
Celkem	108	84	192
	n/N	% (95% IS)	
Pozitivní procentuální shoda	106/108	98,1 (93,5–99,5)	
Negativní procentuální shoda	79/84	94,0 (86,8–97,4)	
Celková procentuální shoda	185/192	96,4 (92,7–98,2)	

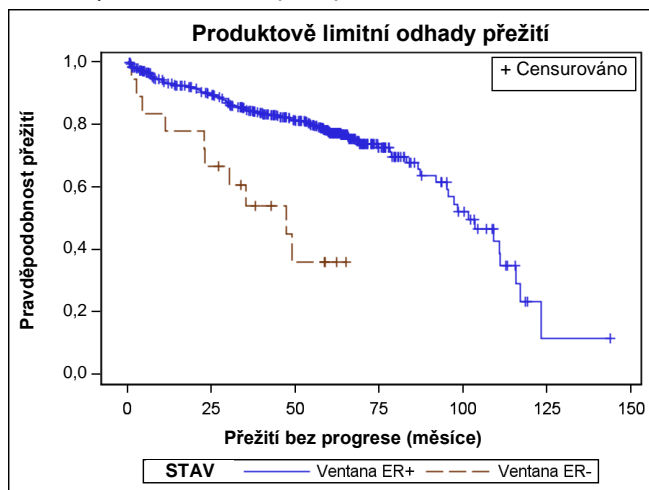
Celková shoda hodnocení mezi detekčními soupravami pro obě platformy byla 96,9% (n = 194) a 96,4% (n = 192) pro BenchMark ULTRA resp. přístroj BenchMark XT. Detekční souprava *ultraView* Universal DAB Detection Kit měla v porovnání se soupravou MIEW DAB Detection Kit hodnoty shody barvení 93,3% (n = 194) a 93,8% (n = 192).

5. Srovnání s výsledkem pacienta

Randomizovaná studie provedená v jednom centru více hodnotiteli byla provedena s použitím klinické kohorty 820 případů invazivního karcinomu prsu. Výsledky přežití bez progresu byly srovnány pro pacienty s různým stavem protilátky CONFIRM anti-ER (SP1), stanovené pomocí přístroje BenchMark ULTRA. Případy byly zahrnuty do analýz, pokud měl pacient potvrzenou diagnózu invazivního karcinomu prsu a obdržel léčbu s primární chirurgickou intervencí s nebo bez pooperační lokální radioterapie následované adjuvantní endokrinní léčbou tamoxifenem (20 mg per os denně) po dobu 5 let. Případy byly vyloučeny z analýz, pokud nebyly k dispozici diagnostické biotické vzorky nebo primárně chirurgické vzorky tkáně, pokud byla již dříve stanovena diagnóza karcinomu (s výjimkou nemelanomové rakoviny kůže) nebo pokud pacient obdržel předchozí nebo adjuvantní chemoterapii. Celkem 1 907 tkáňových mikrotestových výřezů z 594 případů rakoviny prsu s primárním nádorem bylo obarveno na přístroji BenchMark ULTRA. Obarvená sklíčka byla vyhodnocena třemi nezávislými patologi, kteří určili procento obarvených nádorových buněk. Případ je považován za ER pozitivní, pokud jsou jádra zbarvena u alespoň 3 1% invazivních nádorových buněk.⁹

Ve studii bylo 441 pacientů s Ventana ER pozitivním (ER+) stavem a 18 pacientů s Ventana ER negativním (ER-) stavem. Kaplan-Meierova metoda dle stavu CONFIRM anti-ER (SP1) mezi analyzovanou populací s primárním přežitím ukázala silnou separaci mezi Ventana ER+ a ER- případy. ER+ pacienti měli delší doby přežití než pacienti ER-, pokud byla podána léčba tamoxifenem. Medián přežití pro ER+ a ER- pacienty byl 101,6 resp. 47,2 měsíce. Log-rank test prokázal, že rozdíl v přežití byl statisticky významný ($P < 0,001$).

Obrázek 2. Kaplan-Meierův záznam přežití podle Ventana ER stavu



ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

- Jestliže pozitivní kontrola vykazuje slabší barvení, než se očekává, měly by být současně zkontrolovány i další cykly s pozitivní kontrolou, aby bylo možné stanovit, zda je uvedené způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů.
- Pokud je pozitivní kontrola negativní, je nutno ji zkontrolovat, aby bylo zajištěno, že má sklíčko správný štítek s čárovým kódem. Jestliže má sklíčko správný štítek, měly by být současně zkontrolovány i další cykly s pozitivní kontrolou, aby bylo možné stanovit, zda je uvedené způsobeno primární protilátkou nebo některým z běžných sekundárních antigenů. Odběr, fixace nebo odstraňování parafínů z tkání mohlo být provedeno nesprávným způsobem. Sběr tkáně, její fixace a skladování musí probíhat ve správném postupu.
- Vyskytne-li se přílišné barvení pozadí, pravděpodobně je přítomna vysoká koncentrace endogenního biotinu. Je třeba zahrnout krok blokování biotinu.
- Jestliže se nepodařilo odstranit všechny parafín, je potřeba postup pro odstranění parafínu zopakovat.
- Je-li barvení specifickou protilátkou příliš intenzivní, opakujte cyklus s primární protilátkou s inkubační dobou kratší vždy o 4 minuty až do doby dosažení požadované intenzity barvení.
- Jestliže dochází ke smývání řezů tkání ze sklíčka, zkontrolujte, zda jsou podložní sklíčka nabitá kladným nábojem.
- Nápravné činnosti jsou uvedeny v kapitole „Jednotlivé kroky postupu“ v návodu k obsluze barvicího automatu. Můžete se rovněž obrátit na místního zástupce podpory zákazníků.

LITERATURA

- Huang Z, Zhu W, Szekeres G, Xia H. Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor: immunohistochemical assessment on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13(1):91-5.
- Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320(6058):134-139.
- Rocha R, Nunes C, Rocha G, et al. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract*. 2008;204(9):655-62.
- Brock, JE, Hornick, JL, Richardson AL, et al. A comparison of estrogen receptor SP1 and 1D5 monoclonal antibodies in routine clinical use reveals similar staining results. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(3): 396-401.
- Rhodes A, Sarson J, Assam EE, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(4):621-32.
- Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, et al. Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. *JCO*. 2006;24(36):5637-5644.
- Bae YK, Gong G, Kang J, et al. Hormone Receptor Expression in Invasive Breast Cancer Among Korean Women and Comparison of 3 Antiestrogen Receptor Antibodies - A Multi-institutional Retrospective Study Using Tissue Microarrays. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1817-1825.
- O'Connor SM, Beriwal S, Dabbs DJ, et al. Concordance between semiquantitative immunohistochemical assay and oncotype DX RT-PCR assay for estrogen and progesterone receptors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(3):268-72.
- Hammond ME, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(6):907-22.
- ODE Guidance documents, Center for Devices and Radiological Health. Draft: Premarketing approval review criteria for premarket approval of estrogen (ER) or progesterone (PGR) receptors in vitro diagnostic devices using steroid hormone binding (SBA) with dextran coated-charcoal (DCC) separation, histochemical receptor binding assays, or solid phase enzyme immunoassay (EIA) methodologies. Updated 7/29/1996.
- King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*. 1984;307(5953):745-747.
- King WJ, DeSombre ER, Jensen EV, Greene GL. Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors. *Cancer Res*. 1985;45(1):293-304.
- Press MF, Greene GL. Methods in laboratory investigation. An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin. *Lab Invest*. 1984;50(4):480-486.
- Chambers JT, Carcangiu ML, Voynick IM, Schwartz PE. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptor content in 183 patients with endometrial carcinoma. Part II: Correlation between biochemical and immunohistochemical methods and survival. *Am J Clin Pathol*. 1990;94(3):255-260.
- Nedergaard L, Haerslev T, Jacobsen GK. Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS*. 1995;103(1):20-24.
- Swanson PE, Mazoujian G, Mills SE, et al. Immunoreactivity for estrogen receptor protein in sweat gland tumors. *Am J Surg Pathol*. 1991;15:835-841.
- Money SR, Muss W, Thelmo WL, et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in human thyroid. *Surgery*. 1989;106:975-979.
- Diaz NM, Majoujian G, Wick MR. Estrogen receptor protein in thyroid neoplasms. An immunohistochemical analysis papillary carcinoma, follicular carcinoma, and follicular adenoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1991;115:1203-1207.
- Kojima O, Takahashi T, Kawakami S, et al. Localization of estrogen receptors in gastric cancer using immunohistochemical staining of monoclonal antibody. *Cancer*. 1991;67:2401-2406.
- Yokazaki H, Takekura N, Takanashi A, et al. Estrogen receptors in gastric adenocarcinoma: a retrospective immunohistochemical analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988;413:297-302.
- Moriyama N, et al. Localization of estrogen, epidermal growth factor, and transferring receptors in human prostatic carcinoma. *Acta Histochem Cytochem*. 1991;24:61-67.
- Pacchioni D, Revelli A, Casetta G, et al. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the normal urinary bladder and pseudomembranous trigonitis. *J Endocrinol Invest*. 1992;15:719-725.
- Greene GL and Press MF. Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor and progesterone receptor in breast cancer. In: Roberto L. Ceriani, editor. *Immunological Approaches to the Diagnosis and Therapy of Breast Cancer*. New York: Plenum Press; 1987:119-135.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 2010. Atlanta: American Cancer Society; 2010.
- PDQ. Treatment. Health Professionals. Breast Cancer. Downloaded from http://icisun.nci.nih...t_cancer_Physician.html on 4/10/1997.

26. Stierer M, Rosen H, Weber R, et al. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:11-21.
27. Nyholm HC, Nielsen AL, Lyndrup J, et al. Biochemical and immunohistochemical estrogen and progesterone receptors in adenomatous hyperplasia and endometrial carcinoma: Correlations with stage and other clinopathologic features. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167:1334-1342.
28. Barnes DM, Harris WH, Smith P, et al. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation of clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer.* 1996;74:1445-1451.
29. Esteban JM, Felder B, Ahn C, et al. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer.* 1994;74:1575-1583.
30. Layfield LJ, Saria EA, Conlon DH, et al. Estrogen and progesterone receptor status determined by the Ventana ES 320 automated immunohistochemical stainer and the CAS image analyzer in 236 early-stage breast carcinomas: prognostic significance. *J Surgical Oncology.* 1995;61:177-184.
31. Welsh AW, Harigopal M, Wimberly H, et al. Quantitative Analysis of Estrogen Receptor Expression Shows SP1 Antibody Is More Sensitive Than 1D5. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;07. In press. doi:10.1097/PAI.0b013e31825d73b2.
32. Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, et al. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 1996;14:2584-2589.
33. Deamant FD, et al. Estrogen receptor immunochemistry as a predictor of site of origin in metastatic breast cancer. *Applied Immunohistochemistry.* 1993;1:188-192.
34. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. Estrogen receptors in 699 primary breast cancers: A comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;34:221-228.
35. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
36. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2010.
37. CLSI. *Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline.* CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
38. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
39. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1980;73(5): 626-32.
40. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

CONFIRM, BENCHMARK, *ultraView*, VENTANA a logo VENTANA jsou ochrannými známkami společnosti Roche.

Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ ÚDAJE



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)



www.ventana.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany