

# Analys av HER2 i bröstcancer kvalitetssäkrad

## Viktig behandlingsprediktiv och prognostisk faktor



**MÅRTEN FERNÖ**, professor, institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för onkologi, Lunds universitet  
**MONICA HAGLUND**, biomedicinsk analytiker, Klinisk patologi och cytologi, Universitetssjukhuset MAS, Malmö  
**PÅR-OLA BENDAHL**, docent, institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för

onkologi, Lunds universitet  
**HANS OLSSON**, överläkare, laboratoriet för klinisk patologi och genetik, Universitetssjukhuset i Linköping  
**LISA RYDÉN**, docent, överläkare, kirurgiska kliniken, Universitetssjukhuset i Lund  
lisa.ryden@med.lu.se

Omkring 7 000 svenska kvinnor får årligen diagnosen bröstcancer, och på grund av tidig upptäckt, bl a genom hälsokontroll med mammografi, kan två tredjedelar av patienterna botas med lokal behandling (kirurgi och eventuell strålbehandling). Adjuvant systembehandling förhindrar återfall i sjukdomen hos ungefär 15–20 procent av patienterna. Uppskattningsvis får därmed var sjätte kvinna med tidig bröstcancer recidiv inom tio år. Den adjuvanta behandlingen kan vara cytotoxisk, endokrin eller antikroppsbasead, och i dag ges ofta kombinationsbehandling med två eller flera modaliteter.

För att välja individualiserad och skräddarsydd behandling för den enskilda patienten används prognostiska faktorer som delar in patienterna i olika riskgrupper och behandlingsprediktiva faktorer för att välja den lämpligaste terapiformen. Allmänt vedertagna prognostiska faktorer är ålder, lymfkörtelstatus, tumörstorlek och histologisk grad, medan förekomst av östrogen- (ER) och progesteronreceptorer (PgR) huvudsakligen används för att bedöma känslighet för endokrin behandling [1], <http://www.swebcg.roc.se/>.

### HER2-status analyseras rutinmässigt

Överuttryck av tillväxtfaktorreceptorn human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) eller ett ökat antal kopior av HER2-genen (amplifiering) i tumörcellerna korrelerar med en aggressiv form av bröstcancer och därmed med försämrad prognos (Fakta 1) [2-6]. Andelen HER2-positiva bröstcancer varierar i litteraturen mellan 10 och 30 procent [2-6]. Dessa siffror baseras på selekterade patientmaterial, eftersom det saknas publicerade resultat från populationsbaserade material analyserade med standardiserad metod.

Den största kliniska betydelsen har dock HER2 som behandlingsprediktiv faktor för effekten av målstyrd antikroppsbehandling med trastuzumab (Fakta 2). Därför rekommenderar Svenska bröstcancergruppen sedan 2005 att HER2 ska analyseras rutinmässigt i samtliga nydiagnostiserade bröstcancerfall i Sverige. Introduktionen av HER2-analys på ett standardiserat sätt har tidigare beskrivits i Läkartidningen [7].

För patienter med HER2-positiva tumörer är effekten av trastuzumab mycket god, både vid adjuvant behandling av primär bröstcancer efter kemoterapi med riskreduktion av återfall med nästan 50 procent redan efter ett års uppföljning [8]

och vid palliativ behandling av metastaserande sjukdom [9] liksom vid lokalt avancerad bröstcancer [10]. För patienter med normalt uttryck av HER2 i sina tumörer är behandling med trastuzumab inte meningsfull. Det är därför av stor vikt för såväl patienten som sjukvårdsekonomiskt att analys av HER2 utförs med god kvalitet och enligt standardiserade protokoll på samtliga patologiavdelningar som utför HER2-analys. Internationellt bedrivs intensivt kvalitetsarbete kring validering och reproducerbarhet av HER2-analys genom referenslaboratorier och utbyte av bröstcancerpreparat för bedömning (»slide-exchange rings«) [11-16].

Vår artikel presenterar ett kvalitetssäkringsarbete av reproducerbarheten vid svenska patologilaboratorier som rutinmässigt utför HER2-bedömning. Målsättningarna med detta arbete var att

- utvärdera reproducerbarheten mellan 24 av totalt 26 patologiavdelningar i Sverige med avseende på HER2-analys (färgning och bedömning) av primär bröstcancer
- med hjälp av en enkät ta reda på andelen HER2-analyserade fall och bedömningsutfallet vid respektive avdelning.

### STUDIEUPPLÄGG OCH METODER

#### Reproducerbarhetsundersökningen

Elva bröstcancertumörer preparerades vid avdelningen för patologi och cytologi i Malmö i en tissue microarray med två biopsier, diameter 1,0 mm, från varje tumör (Fakta 3) vid två tillfällen (2005 och 2006). Snitt från dessa skickades från Malmö till 25 patologavdelningar i Sverige. Proven placerades i olika ordning på vävnadsmatrisen vid de två tillfällena, och 2006 togs ytterligare ett prov med. De övriga deltagande avdelningarna hade ingen kännedom om att det var samma fall som skickades ut.

Enbart de 24 avdelningar som deltog båda åren är med i nedanstående redovisning av reproducerbarheten. Fallen var utvalda så att de representerade olika nivåer av HER2-innehåll.

### SAMMANFATTAT

**Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)** är en tyrosinkinaserceptor som förekommer överuttryckt i ca 15–20 procent av invasiv bröstcancer och medför ökad risk för återfall i sjukdomen. **HER2-status** kan bestämmas immunhistokemiskt på proteinnivå eller med fluorescent in situ-hybridisering (FISH), som påvisar antalet genkopior. Analysen bör ingå vid rutindiagnostik av bröstcancer.

**Svenska HER2-analysgruppen** utförde under 2005 och 2006 en reproducerbarhetsstudie av HER2-status genom att distribuera elva bröstcancerfall till patologilaboratorier i Sverige som rutinmässigt utför HER2-analys. **Resultaten visar att** reproducerbarheten av HER2-status var god (2005) respektive mycket god (2006) för immunhistokemi och mycket god för FISH vid båda undersöknings-tillfällena.

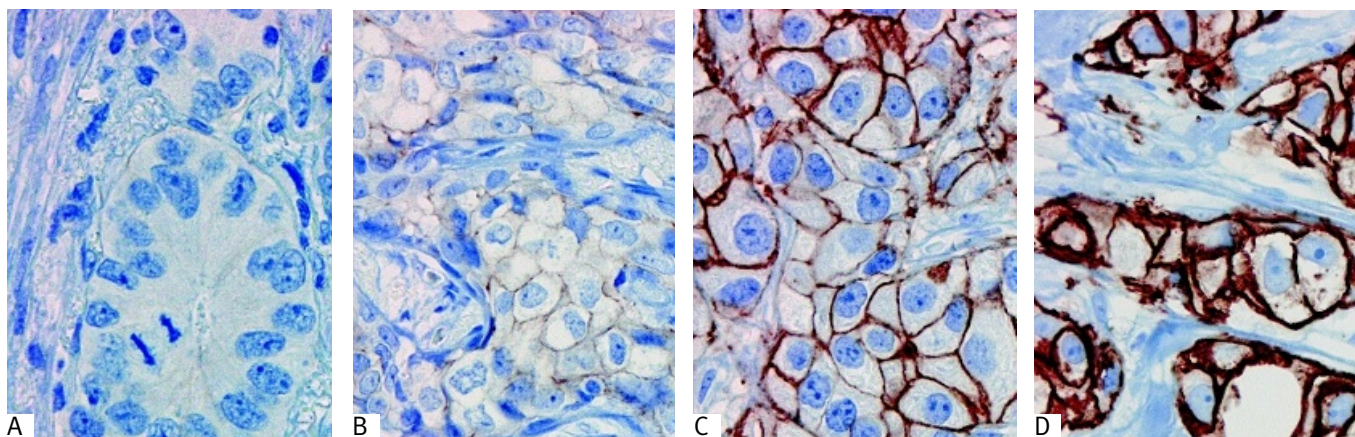


Foto: Monica Haglund

**Figur 1.** HER2-membraninfärgning med immunhistokemi. A: 0 = avsaknad av infärgning eller membraninfärgning hos färre än 10 procent av tumörceller. B: 1+ = svag och ej cirkumferent infärgning av membran hos tumörcellerna. C: 2+ = cirkumferent, svag till måttlig infärgning av membran hos minst 10 procent av tumörcellerna. D: 3+ = cirkumferent och stark infärgning av membran hos minst 10 procent av tumörcellerna.

Alla 24 avdelningarna färgade och analyserade proven själva med immunhistokemi (analys av proteinuttrycket med hjälp av antikroppar), medan inmärkning och analys av antal genkopior (amplifieringsgrad) med FISH (Fakta 4) enbart utfördes vid de elva avdelningar som rutinmässigt använder denna metod. Svenska HER2-analysgruppen, som bildades 2001 [7], har utarbetat riktlinjer för hur analys och bedömning ska göras. Dessa riktlinjer finns på <http://www3.svls.se/sektioner/pa/HER2rekommendation.doc> och innebär bl a att fall som bedöms som 0 eller 1+ med immunhistokemi betraktas som HER2-negativa, medan de som är 2+ eller 3+ (Figur 1) även ska analyseras med FISH (Figur 2) för att utreda om provet är amplifierat eller inte. Varje avdelning använde sin rutinmetod enligt nedanstående.

Den immunhistokemiska undersökningen utfördes med FDA- (Food and Drug Administration) godkända antikroppar och enligt tillverkarnas instruktioner, inkluderande positiva och negativa kontroller. HercepTest (Dako) och Pathway (Ventana) var de testkit som användes av flest laboratorier.

FISH-testning utfördes med FDA-godkända metoder (prober), där PatVysion (Vysis/Abbot) var den metod som flest laboratorier utnyttjade, men även andra metoder användes (INFORM HER-2/neu från Ventana och HER2 FISH pharmDx från Dako). Laboratorierna följde tillverkarnas instruktioner, som inkluderade användning av positiva och negativa kontroller. När metoden innehöll en separat prob för HER2-genen och kromosom 17 grundade sig bedömningen på kvoten mellan antal infärgade genkopior och antal kromosomer (HER2:CEP17). Om kvoten var högre än 2 bedömdes provet som amplifierat. I de fall metoden inte hade separat kromosomprob bedömdes provet som amplifierat om det innehöll fler än sex genkopior (vanligen är amplifieringen tydlig med många genkopior i kluster) (Figur 2).

I studien är reproducerbarheten mätt med kappa-statistik, en analys som innebär att man kompenserar för den slumpmässiga överensstämmelsen [17].

## Enkäten

På det utskickade formuläret fanns frågor angående andelen HER2-analyserade fall av primär bröstcancer som diagnostiserats under 2006 vid respektive avdelning; andelen 0/1+, 2+ och 3+ samt andelen amplifierade 2+ respektive 3+. Enkätsvaren baserades på avdelningarnas egen rapportering, som inte var enhetlig på grund av olika grad av datorisering av provsvar. Det

## FAKTA 1

### HER2

HER2/neu (också känt som ErbB-2) är en av fyra medlemmar i epidermal growth factor receptor (ErbB)-familjen, som bl a har betydelse vid utvecklingen av bröstcancer.

- Det är en cellytereceptor med en intracellulär signaltransduktionsdomän.
- HER2 är involverad i signalöverföringen från cellytan till cellkärnan. Denna signalering påverkar bl a celltillväxt, differentiering och nybildning av blodkärl.

- HER2 har ingen känd ligand men har en viktig funktion i samband med dimeriseringen med andra receptorer inom denna familj.
- Denna dimerisering är nödvändig för att signalkedjan ska aktiveras.
- HER2-genen är en protoonkogen belägen på den långa armen av kromosom 17 (17q11.2–q12).
- Överuttryck av HER2 ses hos 10–30 procent av patienter med primär bröstcancer.

framkom dessutom att analysrutinerna varierade, och några sjukhus analyserade 2+ och 3+ med FISH endast då resultatet skulle påverka val av adjuvant behandling. HER2-analys gjordes inte rutinmässigt på patienter över 70 år vid vissa avdelningar. Det antal avdelningar som resultatgenomgången är baserad på är noterat nedan.

## RESULTAT

Beträffande immunhistokemi rapporterade samtliga 24 avdelningar som deltog vid båda utskicken samma bedömningsresultat (0/1+ vs 2+/3+) för fem (2005) respektive sju (2006) av de elva fall som skickades ut båda åren. För fyra (2005) respektive tre (2006) av de resterande fallen var det bara en avdelning som rapporterade avvikande bedömning. Medelkappavärdet ökade från 0,79 (2005) till 0,86 (2006), vilket indikerar att överensstämmelsen, utöver vad som förväntas av slumpen, har förbättrats från bra till mycket bra. Medelkappavärdet för varje enskild avdelning varierade mellan 0,43 och 0,86 år 2005 och mellan 0,54 och 0,89 år 2006.

De elva avdelningar som använder FISH rapporterade samma resultat (amplifierat vs inte amplifierat) i nio (2005) respektive tio (2006) av de elva fallen. Medelkappavärdet uppvisade mycket god reproducerbarhet både 2005 och 2006 (0,92 och 0,96). Detta värde varierade för avdelningarna mellan 0,80

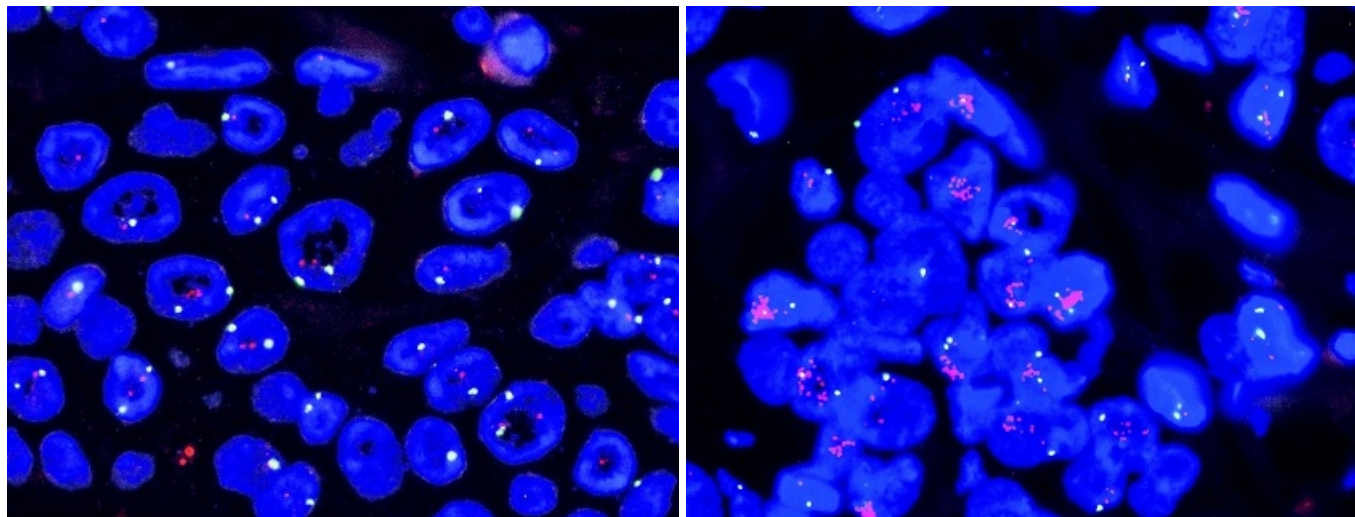


Foto: Monica Haglund

**Figur 2.** FISH-analys. Till vänster: Ej amplifierad tumör med normalt antal genkopior av HER2-genen på kromosom 17. Till höger: Amplifierad tumör med ökat antal genkopior av HER2-genen på kromosom 17.

## FAKTA 2

**Trastuzumab** är en rekombinant humaniserad IgG<sub>1</sub>-monoklonal antikropp mot HER2.

- Trastuzumab har vid både in vitro- och djurförsök visat sig hämma proliferationen av humana tumörceller som överuttrycker HER2.
- Dessutom är trastuzumab en potent mediator för antikropsberoende

cellmedierad cytotoxicitet (ADCC).

- In vitro har trastuzumab-medierad ADCC påvisats hos främst cancerceller som överuttrycker HER2.
- Trastuzumab är i dag etablerad behandling vid både primär och metastaserande HER2-positiv bröstcancer.

## FAKTA 3

**Tissue microarray**

Att samla paraffinbäddat material i en s k tissue microarray är en vävnads- och tidsbesparande teknik för att sedan kunna utföra analyser med immunhistokemi och in situ-hybridisering i stor skala.

- En tissue microarray prepareras genom att man tar biopsier (vanligtvis två) med en diameter av oftast

0,6–1,0 mm från ett representativt område av den ursprungliga paraffinklossen.

- Dessa biopsier placeras sedan i en mottagarkloss, som fylls på med nya biopsier från andra paraffinklossar.
- På detta sätt kan man samla material från över 100 patienter i en paraffinkloss.

## FAKTA 4

**FISH** – fluorescent in situ-hybridisering – är en molekylärbio-logisk teknik som utnyttjar fluorogent inmärkta prober som binder specifikt till en plats på en kromosom.

- På detta sätt kan FISH-tekniken visualisera en gen i en cellkärna.
- Tekniken används inom både forskning och klinisk diagnostik för att identifiera genetiska förändringar.

len HER2-analyserade fall 90 procent av det totala antalet diagnostiserade bröstcancerfall.

Vad gäller utfall för immunhistokemi rapporterade 25 avdelningar totalantalet HER2-analyserade bröstcancerfall, diagnostiserade 2006 (n=4 940) liksom bedömningsutfallet. Andelen 0/1+ var 69 procent (3 392/4 940), andelen 2+ 20 procent (1 009/4 940) och andelen 3+ 11 procent (539/4 940). Andelen rapporterade 0/1+ varierade mellan 58 och 84 procent för olika avdelningar, och motsvarande siffror för 2+ var 8–27 procent och för 3+ 7–15 procent.

19 avdelningar analyserade alla tumörer som bedömts som 2+ immunhistokemiskt med FISH. För dessa var andelen amplifierade fall 12 procent (95/778). Andelen amplifierade 2+ varierade mellan dessa avdelningar. Exempelvis hade en avdelning inget amplifierat fall bland 38 tumörer bedömda som 2+, medan en annan avdelning hade elva amplifierade av 46 fall bedömda som 2+. För 3+ var amplifieringsgraden 90 procent (326/364; 17 avdelningar) och varierade mellan 75 och 100 procent. Med krav på FISH-analys av samtliga 3+ erhöles nödvändig information från 15 avdelningar med sammanlagt 3 109 nydiagnostiserade bröstcancer under 2006. Av dessa var 410 amplifierade (13 procent).

## DISKUSSION

Artikeln beskriver reproducerbarheten av HER2-analys av elva bröstcancertumörer på en tissue microarray, distribuerad till 24 patologavdelningar i Sverige vid två tillfällen (2005 och 2006). I studieupplägget ingick även att laboratorerna fick preparera glasen med den metod för immunhistokemi eller FISH som rutinemässigt används.

### God till mycket god reproducerbarhet

Reproducerbarheten av bedömningen var god (kappa = 0,61–0,80) till mycket god (kappa = 0,81–1,00) för såväl immunhistokemi som FISH [17]. Eftersom samma tumörvävnad skickades ut till de deltagande avdelningarna vid båda bedömningstillfällena är det möjligt att jämföra resultaten över tid. Resultaten visar en tendens till förbättring av överensstämmelse mellan laboratoriernas bedömning med tydlig indikation på att kvalitetssäkringsarbete lönar sig.

Reproducerbarheten är alltså överlag god/mycket god, men undersökningen visar också att klassifikationen HER2-positiv (2+/3+) respektive HER2-negativ (0/1+) för enstaka avdelning-

och 0,96 år 2005 och mellan 0,82 och 0,98 år 2006. Vid de patologavdelningar som angav både totalantalet nya bröstcancer och antalet HER2-analyserade fall under 2006 utgjorde ande-

ar avviker från majoritetens bedömning i upp till tre av de elva fallen. Avvikelseerna är ett observandum som vid upprepning får följas upp med genomgång av analysrutinerna för immunhistokemi. För FISH var överensstämmelsen genomgående mycket god, vilket är i enlighet med internationell erfarenhet där reproducerbarheten för FISH är betydligt bättre än för immunhistokemi utanför referenslaboratorier [13].

## Variationer får utredas vidare

Under 2006 skickades även ut en enkät för att bli en få svar på produktion och bedömningsutfall vid klinisk rutindiagnostik för de deltagande patologi-laboratorierna, eftersom HER2-analys enligt Svenska bröstcancergruppens riktlinjer bör utföras på all nydiagnostiserad bröstcancer. 90 procent av samtliga nydiagnostiserade bröstcancerfall under 2006 analyserades med avseende på HER2-status (baserat på svar från 23 avdelningar). Resultaten från enkäten visar därför att HER2-analys snabbt implementerats i rutindiagnostiken för primär bröstcancer i Sverige.

Att inte alla fall analyserades angavs bero på att vissa sjukhus inte analyserade HER2 i tumörer från patienter äldre än 70 år eller vid lymfkörtelnegativ bröstcancer, eftersom det inte skulle påverka val av adjuvant behandling. Enligt enkäten bedömdes 69 procent som 0/1+, 19 procent som 2+ och 12 procent som 3+ av totalt 4 940 HER2-analyserade fall från de rapporterade avdelningarna. Bedömningsutfallet som rapporterades i enkäten varierade mellan de individuella avdelningarna, vilket kan bero på en selektion av patientgrupper med hög risk för HER2-positivitet vid vissa laboratorier eller på att tumörens egenskaper varierar mellan olika delar av Sverige. Det kan dock inte uteslutas att analys- och/eller bedömningsmässiga skillnader föreligger när HER2-bedömningen utförs rutinmässigt – i motsats till resultaten från de elva brösttumörer som skickades ut för reproducerbarhetskontroll. Orsaken till denna variation i bedömningsutfallet mellan avdelningarna behöver utredas mer.

## Kvalitetsregister och sjukhusjämförelser

Det nationella kvalitetsregistret för bröstcancer kommer att medföra att jämförelse mellan olika sjukhus i Sverige med av-

seende på patologiska och tumörbiologiska faktorer (lymfkörtelstatus, tumörstorlek, histologisk grad, ER och PgR) kan utföras prospektivt. Jämfört med tidigare publicerade siffror är andelen amplifierade bröstcancer i enkätdelen av studien lägre, <15 procent jämfört med 25–30 procent, vilket kan förklaras av att tidigare undersökningar bara inkluderat selekterade patienter [2, 3]. Metoden för undersökningen med självrapporterad enkät tillåter dock inte några säkra slutsatser. Konsekutiva, populationsbaserade analyser som möjliggörs genom rikstäckande register kommer i framtiden att bidra till viktig kunskap om HER2-status.

## KONKLUSION

Sammanfattningsvis pekar denna undersökning på att reproducerbarheten av HER2-analys är mycket god mellan patologi-avdelningarna i Sverige. Eftersom HER2 i dag är en central tumörbiologisk markör i klinisk bröstcancerdiagnostik, framförallt för bedömning av känslighet för antikroppsbehandling med trastuzumab, men även för att bedöma risken för återfall (prognostisk faktor), är fortsatt kvalitetssäkringsarbete mycket viktigt såväl för patienten som rent sjukvårdsekonomiskt.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

■ *Arbetsgruppen för Svenska HER2-analysgruppen doc Thomas Hattschek, Radiumhemmet, Karolinska Universitetssjukhuset Solna, leg BMA Aleksandra Kolaric, kliniken för patologi, Universitetssjukhuset i Örebro, överläkare Anikó Kovács, avdelningen för patologi, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg och leg BMA Ann Olsson, avdelningen för patologi och cytologi, Karolinska Universitetssjukhuset Solna samt BMA Carina Strand, onkologiska forskningsavdelningen Lund har hjälpt till med resultatsammanställning. Patologavdelningarna vid sjukhusen i Borås, Eskilstuna, Falun, Gävle, Göteborg, Helsingborg, Jönköping, Kalmar, Karlskrona, Karlstad, Karolinska Universitetssjukhuset, Linköping, Boden-Luleå, Lund-Kristianstad, Malmö, Skövde (Capio Diagnostik AB), Sankt Görans sjukhus AB (Capio Diagnostik AB), Sundsvall, Trollhättan, Umeå, Uppsala, Västerås, Växjö, Örebro och Medilab AB har deltagit i studien.*

## REFERENSER

- Ciniéri S, Orlando L, Fedele P, Cusmai A, D'Amico M, Rizzo P, et al. Adjuvant strategies in breast cancer: new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gallen International Expert Consensus Conference. *Ann Oncol*. 2007;18 Suppl 6:vi63-5.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
- Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S, et al. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett*. 1994;81:137-44.
- Sjögren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol*. 1998;16:462-9.
- Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, et al. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res*. 2003;9:923-30.
- Schmidt M, Lewark B, Kohlschmidt N, Glawatz C, Steiner E, Tanner B, et al. Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing. *Breast Cancer Res*. 2005;7:R256-66.
- Haglund M, Chebil G, Johansson L. HER2-testning för bröstcancer. Kvalitetssäkrad analys av tillväxtfaktor erbjuds nu på svenska laboratorier. *Läkartidningen*. 2005;102:740-3
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-72.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344:783-92.
- Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW, Eiermann W, Patel R, Fumoleau P, et al. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:759-69.
- Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:501-7.
- Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004;291:1972-7.
- Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6598-607.
- Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, et al. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006;4 Suppl 3:S1-22; quiz S23-4.
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*. 2006;24:3032-8.
- Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Gutschalk T, et al. Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol*. 2007;20:584-91.
- Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London, UK: Chapman & Hall, 1991. p. 403-9.