

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

REF 790-7167

09670564001

IVD  50

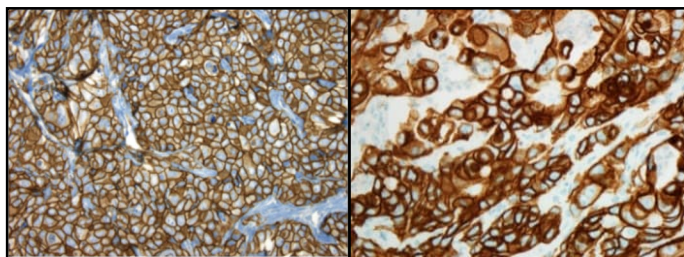


Fig. 1. VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx-farvning i brystkarcinom.

Fig. 2. VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx 3+ farvning i gastrisk karcinom.

TILSIGTET ANVENDELSE

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx er beregnet til semikvantitativ detektion af HER2-antigen ved immunhistokemi i vævssnit af formalinfikseret og paraffinindstøbt brystvæv og gastrisk væv, der er farvet på et BenchMark IHC/ISH-instrument.

Denne IHC-enhed er indiceret som ledsagende diagnosticering til identifikation af brystkræftpatienter, der er kvalificerede til behandling med trastuzumab (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH-amplificeret), pertuzumab (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH-amplificeret), trastuzumab emtansin (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH-amplificeret) eller trastuzumab deruxetecan (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH ikke-amplificeret). Derudover er denne IHC-enhed indiceret som en ledsagende diagnostik til identifikation af patienter med gastrisk cancer, for hvem trastuzumab-behandling overvejes (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH-amplificeret).

Dette produkt skal fortolkes af en kvalificeret patolog og sammenholdes med histologisk undersøgelse, relevante kliniske oplysninger og egnede kontroller.

Dette antistof er beregnet til in vitro diagnostisk (IVD) brug.

RESUMÉ OG FORKLARING

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (VENTANA HER2 (4B5) RxDx-analyse) indeholder et monoklonalt kanin-antistof (klon 4B5), der er rettet mod det interne domæne i den humane epidermale vækstfaktorreceptor 2 (HER2). HER2 blev klonet og beskrevet.¹ Klon 4B5 har vist sig at reagere med et 185-kDa protein fra SK-BR-3-cellelysater via Western blot. SK-BR-3 er en cellelinje i brystkarcinomer med 128-gange overekspression af HER2 mRNA.² Størrelsen af det identificerede bånd stemmer overens med det, der blev rapporteret for HER2 protein (185 kDa).¹ Immunhistokemiske (IHC) forsøg med transfekterede cellelinjer (HEK293) har vist, at klon 4B5 farver celler, der er transfekteret med HER2 og celler transfekteret med HER4, dog ingen farvning af celler transfekteret med HER1 eller HER3 blev observeret, og data for Western-blot med rekombinant HER4-protein indikerer desuden, at klon 4B5 genkender en HER4-epitop.³ På trods af dette er det ikke blevet observeret, at HER2 (4B5) krydsreagerer med HER4 i IHC-farvning af formalinfikseret og paraffinindstøbt (FFPE) brystvæv.⁴

HER2 er en transmembranreceptor tyrosinkinase med en struktur, der minder om den epidermale vækstfaktorreceptor.^{5,6} Der er konstateret genamplifikation og tilsvarende overekspression af HER2 i en række tumorer, herunder brystkarcinomer.^{5,6,7} Proteinoverekspression på grund af amplifikation af HER2-genet er den primære årsag til HER2-medieret tumorigenese.⁵ Genamplifikation resulterer typisk i en markant stigning i HER2-receptorer ved cellemembranen.^{5,6} Overekspression af HER2 øger signaltransduktionen og opregulerer proliferation og differentiering, hvilket i sidste ende forårsager tumordannelse.^{5,6}

Et spektrum af HER2-proteinoverekspression er blevet observeret i fravær af genamplifikation.⁸ Adskillige faktorer er blevet foreslået for at forklare mellemniveauer af HER2-proteinoverekspression i tilfælde af brystkræft i fravær af genamplifikation, herunder

krydstale mellem HER2-signalvejen og østrogenreceptorens signalvej.^{8,9} HER2-proteinoverekspression, der ikke betragtes som overekspression, kan klassificeres som HER2-lav ekspression.^{8,10,11}

HER2-proteinoverekspression og/eller genamplifikation forekommer i gastrisk adenokarcinom og adenokarcinom i gastroesophageal junction.^{12,13,14} I de forskellige publicerede undersøgelser er der rapporteret meget forskelligartet hyppighed af HER2-overekspression. I et af de største screeningsdatasæt, som omfattede 3803 patienter med gastrisk adenokarcinom og adenokarcinom i gastroesophageal junction, rapporteredes imidlertid, at 22 procent af patienterne testede positive for HER2-proteinoverekspression eller genamplifikation.¹⁵

KLINISK SIGNIFIKANS

Brystkræft er den mest almindelige diagnosticerede kræft hos kvinder i verden.¹⁶ Tidlig detektion og korrekt behandling kan have en væsentlig effekt på den samlede overlevelse.^{7,17} Ca. 15 til 30 procent af invasive duktales former for brystkræft er positive for HER2.^{7,10} Næsten samtlige tilfælde af Pagets sygdom og op til 90 procent af alle tilfælde af duktal karcinom in situ af komedotypen er positive.^{18,19} HER2-positiv status har defineret en undergruppe af brystkræftpatienter, som har gavn af HER2-måltrettet terapi i over 20 år.^{7,17} Den HER2-positiv population er historisk blevet defineret som de patienter, som påviser HER2-proteinoverekspression vurderet ved immunhistokemi (IHC) baseret på et semikvantitativt IHC-scoringssystem (0, 1+, 2+ and 3+) og/eller genamplifikation vurderet ved in situ-hybridisering (ISH).¹⁷ HER2-positivitet hænger kraftigt sammen med proteinoverekspression (IHC-score på 3+). I tilfælde med grænsetilfælde af overekspression (IHC-score 2+, tvetydig) kan en bekræftende reflektstest for at vurdere genamplifikation være påkrævet ifølge den etablerede HER2-vurderingsalgoritme.¹⁷

Lægemidler på markedet, herunder Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) og KADCYLA (ado-trastuzumab emtansin/trastuzumab emtansin) har påvist klinisk effekt i HER2-positiv brystkræftpatienter ved at hæmme og i nogle tilfælde reducere tumorvæksten.²⁰⁻²⁴ Trastuzumab og pertuzumab er humaniserede monoklonale antistoffer, der binder sig til HER2-proteinet på celleoverfladen og bryder HER2-medieret signaltransduktion.^{20,24,25} Trastuzumab emtansin er et antistofkonjugat sammensat af trastuzumab og det cytotoxiske middel DM1 konjugeret gennem en ikke-spaltbar linker.²³ Kun patienter med HER2-positiv brystkræft (IHC-score 3+ eller 2+ med en bekræftet HER2-amplificeret status) bør have fordel af behandling med trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA) eller trastuzumab emtansin (KADCYLA).^{16,18}

Cirka 40-50 procent af brystkræftpatienter har tumorer, der ikke viser amplifikation af HER2-genet og ikke overeksprimerer receptoren, men der detekteres dog lave niveauer af HER2-ekspression.^{8,10} Tilfælde med HER2-lav-ekspression (IHC-score 1+ eller 2+ (med en bekræftet HER2-status af ikke-amplificeret)) betragtes typisk som HER2-negative og ekskluderes fra HER2-rettede behandlingsvalg.⁸ For nylig er der observeret fordele ved anti-HER2-behandlingen trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®) hos brystkræftpatienter med lave niveauer af HER2-ekspression.^{26,27} Trastuzumab deruxetecan er et antistof-lægemedelkonjugat, der indeholder en base af HER2-rettet monoklonalt antistof (trastuzumab), en spaltelig linker og et cellemembranpermeabelt exatecanderivat (en payload af topoisomerase I-hæmmer).¹⁰

In vitro-diagnostik til evaluering af HER2-status hos brystkræftpatienter er vigtig for at hjælpe klinikerne med at bestemme behandling med trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansin (KADCYLA) eller trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®).¹⁷ Den IHC-baserede detektion af HER2-proteinoverekspression anvendes som hjælpemiddel ved vurdering af brystkræftpatienter, til hvem de HER2-rettede behandlinger trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansin (KADCYLA) eller trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®) overvejes.

Gastrisk cancer er den femtehyppigste kræftsygdom og en af de primære årsager til kræftrelateret død på verdensplan.¹³ Kirurgi er den mest almindelige behandling for gastrisk cancer.^{14,28} De fleste tilfælde af gastrisk cancer opdaget på et fremskredet stadium, og operationen er ofte vanskelig at udføre.^{14,28} Kemoterapi anvendes til behandling af fremskredet gastrisk cancer, selvom overlevelsen blandt disse patienter er meget lav.^{14,28} Den HER2-rettede terapi trastuzumab er en grundpille i behandlingen af invasiv brystkræft og har terapeutisk værdi i behandlingen af patienter med gastrisk cancer, hvor receptoren overeksprimeres.^{12,14} Demonstration af HER2-genamplifikation og/eller -proteinoverekspression er afgørende for udvælgelse af patienter til trastuzumab-behandling.^{12,14} Kliniske undersøgelser har vist, at patienter med brystkræft eller gastrisk cancer med høj HER2-proteinoverekspression og/eller -genamplifikation har størst gavn af trastuzumab.^{12,21} Den IHC-baserede påvisning af HER2-proteinoverekspression bruges som en hjælp til vurdering af patienter med gastrisk cancer, til hvem behandling med trastuzumab (Herceptin) overvejes.

PROCEDURENS PRINCIP

VENTANA HER2 (4B5)-analyse er et monoklonalt kanin-antistof, der binder sig til HER2 i FFPE-vævssnit. Det specifikke antistof kan lokaliseres ved hjælp af et sekundært antistof-HRP-konjugat (*ultraView Universal DAB Detection Kit*). Det specifikke antistof-enzymkompleks visualiseres derefter med et udfældende enzymreaktionsprodukt. Der inkuberes på hvert trin for at opnå nøjagtig tid og temperatur. Ved afslutningen af hvert inkubationstrin skyller instrumentet vævssnittene for at stoppe reaktionen og fjerne ubundet materiale, der ville hindre den ønskede reaktion på de efterfølgende trin. Instrumentet anvender også Liquid Coverslip, der minimerer fordampning af de vandige reagenser fra præparatobjektglasset.

Kliniske tilfælde skal evalueres inden for rammerne af ydeevnen af passende kontroller. Det anbefales at medtage en positiv vævskontrol, der er fikseret og behandlet på samme måde som patientpræparatet (for eksempel et svagt positivt brystkarcinom). Ud over farvning med VENTANA HER2 (4B5)-analyse skal et andet objektglas farves med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. For at testen kan betragtes som gyldig, skal det positive kontrolvæv udvise membranfarvning af tumorceller. Disse komponenter skal være negative, når de farves med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Derudover anbefales det, at der medtages et negativt vævskontrolobjektglas (for eksempel et HER2-negativt brystkarcinom eller gastrisk karcinom) for hver batch af prøver, der behandles og køres på et BenchMark IHC/ISH-instrument. Denne negative vævskontrol skal farves med VENTANA HER2 (4B5) RxDx for at kontrollere, at antigenforbedringen og andre forbehandlingsprocedurer ikke dannede falsk positiv farvning.

LEVERET MATERIALE

VENTANA HER2 (4B5)-analyse indeholder tilstrækkeligt reagens til 50 tests.

En 5 mL-dispenser med VENTANA HER2 (4B5)-analyse indeholder cirka 30 µg monoklonale kanin-antistoffer rettet mod humant HER2-antigen.

Antistoffet er fortyndet i 0.05 M tris-bufret saltvandsopløsning, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 med 0.3 % bærerprotein og 0.05 % natriumazid, som er et konserveringsmiddel. Der er spor af kalvefosterserum, cirka 0.25 %, fra stamopløsningen.

Specifik antistofkoncentration er cirka 6 µg/mL.

VENTANA HER2 (4B5)-analyse indeholder et kanin-IgG fortyndet fra vævskultursupernatanter.

Se det relevante metodeark til VENTANA-detektionskit for at få yderligere oplysninger om immunhistokemiske farvningsprocedurer: Procedurens princip, Materiale og metoder, Prøvetagning og forberedelse til analyse, Metoder til kvalitetskontrol, Fejlfinding, Fortolkning af resultater og Begrænsninger.

NØDVENDIGE MATERIALER, SOM IKKE MEDFØLGER

Farvereagenser såsom VENTANA-detektionskits og hjælpekomponenter, herunder objektglas med negative og positive kontrolvæv, medfølger ikke.

Det er ikke alle produkter, der er nævnt i metodearket, som kan fås i alle geografiske områder. Indhent oplysninger hos den lokale supportrepræsentant.

Nedenstående reagenser og materialer kan være påkrævet ved farvning, men medfølger ikke:

1. Anbefalet kontrolvæv
2. Objektglas, positivt ladede
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat.nr. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView DAB Detection Kit* (kat.nr. 760-500 / 05269806001)
5. EZ Prep Concentrate (10X) (kat.nr. 950-102 / 05279771001)
6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat.nr. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Predilute) (kat.nr. 650-010 / 05264839001)
8. ULTRA LCS (Predilute) (kat.nr. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat.nr. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat.nr. 950-224 / 05424569001)
11. Hematoxylin II (kat.nr. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (kat.nr. 760-2037 / 05266769001)
13. Generelt laboratorieudstyr
14. BenchMark IHC/ISH-instrument

OPBEVARING OG STABILITET

Opveares ved 2-8 °C efter modtagelsen, og når de ikke anvendes. Må ikke nedfryses.

For at sikre korrekt reagenstillførsel og antistoffets stabilitet skal kapslen sættes på dispenseren igen efter hver brug, og dispenseren skal omgående anbringes i køleskab i opret position.

Hver antistofdispenser er mærket med udløbsdato. Ved korrekt opbevaring er reagenset stabilt indtil den dato, der er angivet på etiketten. Brug ikke reagenset efter udløbsdatoen.

PRÆPARATFORBEREDELSE

Rutinemæssigt behandlede FFPE-væv er egnede til brug med dette primære antistof, når det anvendes med VENTANA-detektionskits og BenchMark IHC/ISH-instrumenter. Det anbefalede vævsfiksativ er 10 % neutral buffer-formalin.²⁹ Objektglassene skal farves omgående, da skårne vævssnits antigenicitet muligvis mindskes over tid.

Det anbefales, at der køres positive og negative kontroller samtidig med ukendte præparater.

Cirka 4 µm tykke snit skæres og samles op på objektglas. Objektglassene skal være af typen Superfrost Plus eller tilsvarende. Undersøgelser viser, at lufttørrede udskårne vævssnit og cellelinjer, der opbevares ved en temperatur på 2-8 °C, er holdbare i mindst 45 dage. Det enkelte laboratorium skal validere stabiliteten af objektglasset med vævssnittet ud fra deres egne procedurer og opbevaringsbetingelser.

ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER

1. Til in vitro diagnostisk (IVD) brug.
2. Kun til faglig anvendelse.
3. Brug ikke efter det angivne antal tests.
4. Positivt ladede objektglas kan være modtagelige over for stressfaktorer i det omgivende miljø, hvilket kan medføre uhensigtsmæssig farvning. Bed din Roche-repræsentant om yderligere oplysninger om, hvordan denne type objektglas skal anvendes.
5. Materialer af human eller animalsk oprindelse skal håndteres som biologisk farligt materiale og bortskaffes i henhold til gældende forholdsregler. I tilfælde af eksponering skal de ansvarlige myndigheders sundhedsdirektiver følges.^{30,31}
6. Undgå, at reagenser kommer i kontakt med øjne og slimhinder. Vask med rigelige mængder vand, hvis reagenserne kommer i kontakt med følsomme områder.
7. Undgå mikrobiel kontamination af reagenserne, da det kan forårsage fejlbehæftede resultater.
8. Når det anvendes i henhold til vejledningen, er dette produkt ikke klassificeret som et farligt stof. Konserveringsmidlet i reagenset er natriumazid. Symptomer på overeksponering for natriumazid omfatter hud- og øjenirritation og irritation af slimhinder og øvre luftveje. Koncentrationen af natriumazid i dette produkt er 0.05 % og opfylder ikke kriterierne for et farligt stof. Ophobning af NaN3 kan reagere med bly- og kobber-VVS-rør og danne meget eksplosive metalazider. Skyl med store mængder vand efter bortskaffelse for at forhindre azidakkumulering i VVS-rørene.³² Systemiske allergiske reaktioner kan forekomme hos følsomme individer.
9. For yderligere information om brugen af denne enhed henvises til BenchMark IHC/ISH-instrumentets brugervejledning og brugsanvisningerne til alle nødvendige komponenter, som findes på navifyportal.roche.com.
10. Indhent oplysninger hos lokale og/eller statslige myndigheder vedrørende den anbefalede metode til bortskaffelse.
11. Mærkning af produktsikkerhed følger primært EU's GHS-vejledning. Sikkerhedsdatablade er tilgængelige efter anmodning for faglige brugere.
12. For at rapportere mistanke om alvorlige hændelser i forbindelse med denne enhed, skal du kontakte den lokale Roche-repræsentant og den kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren har etableret sig.

FARVNINGSPROCEDURE

VENTANA primære antistoffer er blevet udviklet til brug på BenchMark IHC/ISH-instrumenter i kombination med VENTANA-detektionskits og -tilbehør. Se nedenstående tabeller vedrørende anbefalede farvningsprotokoller.

Dette antistof er optimeret til specifikke inkubationstider, men brugeren skal validere resultater, der opnås med dette reagens.

Parametrene for de automatiserede procedurer kan vises, udskrives og redigeres i henhold til den procedure, der er beskrevet i instrumentets brugervejledning. Se det relevante metodeark til *ultraView DAB Detection Kit* for at få yderligere oplysninger om IHC-farvningsprocedurer.

For yderligere oplysninger om korrekt brug af denne enhed henvises til inline-dispensersens metodeark, som hører til P/N 790-7167.

BEMÆRK: Farvningsprocedurer er sammenfattet i Tab. 1 (For vurdering af HER2-positivitet og HER2-lav i brystkræfttilfælde) og Tab. 2 (For vurdering af HER2-positivitet kun i

brystkræfttilfælde) og Tab. 3 (For vurdering af HER2-positivitet i tilfælde med gastrisk cancer). Trinnene i den anbefalede farvningsprotokol, herunder celleforbehandling og antistofinkubation, er de samme for al HER2-brystkræftscreening, men farvningsprocedurerne har forskellige niveauer af brugerændringer. Ved screening af patienter for potentiel HER2-lav-vurdering, skal farvningsproceduren i Tab. 1 anvendes. Hvis hensigten omfatter at udelukke HER2-lav status (defineret som IHC-score 1+ eller 2+ (med en bekræftet HER2-ikke-amplificeret status)), så skal farvningsproceduren angivet i Tab. 1 anvendes. Hvis hensigten kun er at rapportere HER2-status af positiv (defineret som IHC-score 3+ eller 2+ med en bekræftet HER2-status af amplificeret), kan procedurerne i Tab. 1 eller Tab. 2 anvendes. For at sikre den mest omfattende udnyttelse af resultaterne for enten HER2-status af lav eller HER2-status af positiv i brystkræfttilfælde, anbefales det kraftigt at bruge farvningsproceduren, der er anført i Tab. 1.

Farvningsprocedure for al HER2-vurdering inklusive potentiel vurdering af HER2-lav i brystpræparater

Farvningsprotokollen og -proceduren angivet i dette afsnit og Tab. 1 kan bruges ved alle HER2-screeninger for brystkarcinomtilfælde og skal anvendes ved vurdering af patientprøver for potentiel HER2-lav terapi. Afvigelse fra den anbefalede farvningsprotokol kan give uacceptable HER2-farvede prøver med en ændret HER2-score, især i tilfælde med lav HER2-ekspression (IHC 1+). Især faldende eller øgede celleforbehandlingstider vil sandsynligvis producere HER2-farvede prøver med ændrede HER2-scorer, hvilket kan resultere i beslutninger om u hensigtsmæssige behandlinger til patienter. Den farvningsprocedure, der er anført i Tab. 1, tillader ikke ændring af celleforbehandling eller antistofinkubationstid i forsøg på at mindske denne risiko, da dette er den eneste farvningsprotokol, der er valideret til brug ved vurdering af potentielle HER2-lav-patientprøver.

Tab. 1. Farvningsprotokol for VENTANA HER2 (4B5)-analyse for al HER2-vurdering i brystpræparater inklusive vurdering af potentiel HER2-lav på et BenchMark IHC/ISH-instrument.

Proceduretype	Metode		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA eller BenchMark ULTRA PLUS
Farvningsprocedure	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Antistof (primært) *	VENTANA HER2 4B5 Ab-16 min. eller CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig-16 min.	VENTANA HER2 4B5 Ab-16 min. eller CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig-16 min.	VENTANA HER2 4B5 Ab-12 min. eller CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig-12 min.
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter		
Efterfølgende kontrastfarve	Bluing, 4 minutter		

* Dette er en forprogrammeret tilstand og ikke et trin, brugeren kan vælge.

Alternative farvningsprocedurer kun relevante for potentiel HER2-positivitet vurdering i brystprøver og gastrikprøver.

Farvningsprocedurerne og -protokollerne angivet i Tab. 2 og Tab. 3 er beregnet til at blive anvendt i vurderingen af HER2-positivitet (defineret som proteinoverekspression, IHC-score 3+ eller 2+ (med en bekræftet HER2-amplificeret status)) og ikke i vurdering af HER2-lav ekspression (defineret som IHC-score 1+ eller 2+ (med en bekræftet HER2-ikke-amplificeret status)). De anbefalede celleforbehandlings- og antistofinkubationstider, der er beskrevet i Tab. 2 og Tab. 3, er ikke låst og kan ændres af brugeren. Potentielle årsager til ændring af parametre omfatter variation i vævsfiksering og -behandling (afvigelse fra anbefalet fiksering eller behandling af prøver), laboratorieinstrumenter og -miljø samt læserpræferencer. Se "Immunohistochemistry Principles and Advances" for yderligere information om fikseringsvariabler.³³ Brugere, der afviger fra anbefalede farvningsprotokoller, er ansvarlige for fortolkning og validering af patientresultater.

Tab. 2. Anbefalet farvningsprotokol for VENTANA HER2 (4B5)-analyse med *ultraView* DAB Detection Kit i præparater af brystvæv på et BenchMark IHC/ISH-instrument.

Proceduretype	Metode		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA eller BenchMark ULTRA PLUS
Farvningsprocedure	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren
Afparaffinerings	Valgt	Valgt	Valgt
Cell Conditioning (Antigenafmaskning)	CC1, Mild	CC1, Mild	ULTRA CC1, Mild
Antistof (primært)	16 minutter, 37 °C	16 minutter, 37 °C	12 minutter, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Valgt		
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter		
Efterfølgende kontrastfarve	Bluing, 4 minutter		

Tab. 3. Anbefalet farvningsprotokol for VENTANA HER2 (4B5)-analyse med *ultraView* DAB Detection Kit i præparater af gastrisk væv på et BenchMark IHC/ISH-instrument.

Proceduretype	Metode		
	BenchMark GX	Benchmark XT	BenchMark ULTRA
Farvningsprocedure	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren	<i>ultraView</i> DAB-farvningsproceduren
Afparaffinerings	Valgt	Valgt	Valgt
Cell Conditioning (Antigenafmaskning)	CC1, Mild	CC1, Mild	ULTRA CC1, Mild
Antistof (primært)	16 minutter, 37 °C	16 minutter, 37 °C	12 minutter, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Valgt		
Kontrastfarve	Hematoxylin II, 4 minutter		
Efterfølgende kontrastfarve	Bluing, 4 minutter		

METODER TIL KVALITETSKONTROL

Cellelinjekontroller

Som et separat produkt har Ventana fire formalinfikserede cellelinjekontroller indstøbt i paraffin, udsåret og placeret på et enkelt ladet objektglas. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (P/N 781-2991) kan bruges til foreløbig validering af instrumentet eller behandlingsmetoden til farvning af objektglas med VENTANA HER2 (4B5)-analyse. Disse fire cellelinjekontroller kendetegnes ved in situ-hybridisering for genkopinum, Tab. 4. Hvis cellelinjerne behandles og farves korrekt, antager de farve som beskrevet på metodearket til PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Hvis den indikerede farvning ikke er tydelig i de relevante kerner, især kontrol 1+ og 2+, skal vævsfarvningerne gentages.

Tab. 4. Karakteristika for PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

IHC-score for HER2	Cellelinje	HER2/Chr17-forhold*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* HER2/Chr17-forholdet er gennemsnittet af tre lots med PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, der er bestemt ved hjælp af fluorescerende in situ-hybridisering (FISH).

POSITIV VÆVSKONTROL

Positivt kontrolvæv, der fikseres og behandles på samme måde som patientprøverne, skal køres for hvert sæt af testforhold og med hver VENTANA HER2 (4B5)-analysefavningsprocedure. Bedst mulig laboratoriepraksis skal omfatte et positivt kontrolsnit på samme objektglas som testvævet. Dette hjælper med at identificere fejl i forbindelse med påføringen af reagens på objektglasset. Væv med svag positiv farvning er bedst egnet til kvalitetskontrol. Kontrolvæv kan indeholde både positive og negative farvningskomponenter og kan benyttes både som positiv og negativ kontrol. Kontrolvæv skal være en ny obduktionsprøve, biopsiprøve eller kirurgisk præparat, der er klargjort eller fikseret så hurtigt som muligt på en måde, der er identisk med testsnittene.

Dette væv kan overvåge alle trin i analysen fra vævsforberedelse til farvning. Brug af et vævssnit, der er fikseret eller behandlet på en anden måde end testpræparatet, kan bruges som kontrol for alle reagenser og metodetrin undtagen fiksering og forberedelse af væv. Ideelt set bør væv, der vides at have svag, men positiv farvning, vælges for at sikre, at systemet er følsomt over for små mængder reagensnedbrydning eller problemer med IHC-metoden. Neoplastisk væv, der er HER2-positivt, er dog generelt stærkt positivt på grund af dets patologiske natur (overekspression).

Kendte positive vævskontroller må udelukkende benyttes til overvågning af reagensernes og instrumenternes funktion, og ikke som hjælp til at formulere en specifik diagnose for testprøver. Hvis de positive vævskontroller ikke udviser positiv farvning, skal resultaterne for testpræparaterne anses for ugyldige.

Et eksempel på en positiv kontrol for VENTANA HER2 (4B5)-analyse er et kendt, svagt HER2-positivt invasivt brystkarcinom eller et svagt positivt gastrisk karcinompræparat. Vævskomponenterne i positiv farvning (membranøs farvning af neoplastiske celler) bruges til at bekræfte, at antistoffet blev påført, og at instrumentet fungerede korrekt.

Negativ vævskontrol

Det samme objektglas, der anvendes til den positive vævskontrol (duktalt eller lobulært invasivt brystkarcinom eller gastrisk karcinom), kan anvendes som negativ vævskontrol. Ikke-farvningskomponenterne (omgivende stroma, lymfoide celler og blodkar) viser typisk fravær af specifik farvning og indikerer en specifik baggrundsfarvning (falsk positiv) med det primære antistof. Brug et kendt negativt væv, der er fikseret, behandlet og indstøbt på samme måde som patientprøven.

Negativ reagenskontrol

Der skal køres en negativ reagenskontrol for hvert præparat som en hjælp til fortolkning af resultaterne. En negativ reagenskontrol anvendes i stedet for det primære antistof til at evaluere uspecifik farvning. Objektglasset skal farves med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubationstiden for den negative reagenskontrol skal være den samme som inkubationstid for primært antistof.

Uforklarede uoverensstemmelser

Uforklarede uoverensstemmelser i kontroller skal straks rapporteres til den lokale supportrepræsentant. Hvis resultaterne af kvalitetskontrol ikke overholder specifikationerne, er patientresultaterne ugyldige. Der henvises til afsnittet Fejlfinding. Find og korrigér problemet, og gentag derefter patientprøverne.

Analyseverifikation

Før den første anvendelse af et antistof eller farvningsystem i en diagnostisk procedure bør antistoffets specificitet verificeres ved at teste det på en række væv med kendte immunhistokemiske præstationskarakteristika, der repræsenterer kendt positivt og negativt væv (se de Metoder til kvalitetskontrol, der blev beskrevet tidligere i dette afsnit indlægssedlen, og kvalitetskontrollanbefalingerne fra College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,³⁴ eller CLSI Approved Guideline³⁵ eller begge dokumenter). Disse kvalitetskontrolprocedurer skal gentages for

hvert nyt antistoflot, eller når der er en ændring i analyseparametre. Brystkræftvæv og gastrisk cancervæv med kendt HER2-status er egnet til analyseverifikation.

FORTOLKNING AF FARVNINGEN / FORVENTEDE RESULTATER

Den automatiserede immunfarvningsprocedure med VENTANA får et brunt (DAB) reaktionsprodukt til at udfældes på de antigensteder, der lokaliseres af VENTANA HER2 (4B5)-analyse. En kvalificeret patolog, som har erfaring med immunhistokemiprocedurer, skal evaluere kontrollerne og kvalificere det farvede produkt, før resultaterne fortolkes.

Positive kontroller

Den farvede positive vævskontrol skal først undersøges for at sikre, at alle reagenser fungerer korrekt. Tilstedeværelsen af et relevant farvet reaktionsprodukt i membranen på målcellernes kerner er tegn på positiv reaktivitet. Afhængigt af inkubationstiden og styrken af det anvendte hematoxylin vil kontrastfarvningen resultere i en lys- til mørkeblå farvning af cellekernerne. For kraftig eller ufuldstændig modfarvning kan bringe korrekt fortolkning af resultater i fare. Hvis den positive vævskontrol ikke fremviser positiv farvning, skal alle resultater med testpræparaterne anses for ugyldige.

Negative vævskontroller

Den negative vævskontrol skal undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere den specifikke mærkning af målantigenet med det primære antistof. Fraværet af specifik farvning i den negative vævskontrol bekræfter manglen på antistofkrydsreaktivitet over for celler eller cellebestanddele. Hvis vævet er kontrastfarvet, forekommer der muligvis farvning uden om cellen, dvs. i det interstitielle rum. Hvis der opstår specifik farvning på den negative vævskontrol, skal patientpræparatets resultater anses som ugyldige.

Negative reagenskontroller

Uspecifik farvning vil, hvis den er til stede, have et diffust udseende. Sporadisk let farvning af bindevæv kan også observeres i vævssnit, der er formalinfikseret for kraftigt. Intakte celler bør anvendes til fortolkning af farvningsresultater, da nekrotiske eller degenererede celler ofte farves uspecifikt.

Patientvæv

Patientpræparater skal undersøges sidst. Positiv farvningsintensitet bør vurderes inden for rammerne af baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som ved enhver immunhistokemitest betyder et negativt resultat, at det pågældende antigen ikke blev detekteret, og ikke, at antigenet er fraværende i de analyserede celler eller væv. Når ethvert immunhistokemisk resultat fortolkes, bør morfologien for hver vævsprøve også undersøges ved brug af et hematoxylin- og eosinfarvet snit. Patientens morfologiske fund og relevante kliniske data skal fortolkes af en kvalificeret patolog.

En kvalificeret patolog med erfaring i immunhistokemiprocedurer skal evaluere positive og negative kontroller og kvalificere det farvede produkt, før resultaterne fortolkes.

Scoringsregler for fortolkning af VENTANA anti-HER2 (4B5) AntiBody i brystkarcinom

Følgende tabeller opstiller farvningskriterier. Se VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx-fortolkningsvejledningen for brystkarcinom eller gastrisk karcinom (P/N 1021957DA) for at få flere oplysninger med billeder af farvning med VENTANA HER2 (4B5)-analyse.

Tab. 5. Kriterier for intensitet og mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5)-analyse i brystkarcinom ved brug af farvningsproceduren i Tab. 1.

Farvningsmønster	HER2 (4B5)-score (rapport til behandelende læge)	Anvendelse af farvningsprocedurer i Tab. 1: Anbefalet rapporteringsstatus	Klinisk anvendelse
Ingen membranfarvning observeret eller, Svag, delvis farvning af membranen i 10 % eller færre af cancercellerne	0	HER2-negativ	Ingen
Svag, delvis farvning af membranen i mere end 10 % af cancercellerne	1+	HER2-lav ekspression	ENHERTU® (trastuzumab deruxtecan)

Farvningsmønster	HER2 (4B5)-score (rapport til behandlende læge)	Anvendelse af farvningsprocedurer i Tab. 1: Anbefalet rapporteringstatus	Klinisk anvendelse
Svag til moderat fuldstændig farvning af membranen i over 10 % af cancercellerne	2+*	HER2-lav ekspresion	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansin)
	2+*	HER2-positiv/overekspression	
Intens, fuldstændig farvning af membranen i over 10 % af cancercellerne	3+	HER2-positiv/overekspression	

* Anbefalet reflekstest til at vurdere genamplifikation i henhold til ASCO/CAP-vejledning

Tab. 6. Kriterier for intensitet og mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5) RxDx-analyse i brystkarcinom ved brug af farvningsproceduren i Tab. 2.

Farvningsmønster	HER2 (4B5)-score (rapport til behandlende læge)	Anvendelse af farvningsprocedurer i Tab. 2: Anbefalet rapporteringstatus	Klinisk anvendelse
Ingen membranfarvning observeret eller, Svag, delvis farvning af membranen i 10 % eller færre af cancercellerne	0	HER2-negativ	Ingen
Svag, delvis farvning af membranen i mere end 10 % af cancercellerne	1+	HER2-negativ	
Svag til moderat fuldstændig farvning af membranen i over 10 % af cancercellerne	2+*	HER2-negativ	

Tab. 7. Kriterier for intensitet og mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5)-analyse i gastrisk karcinom ved brug af farvningsproceduren i Tab. 3.

Farvningsmønster – resektionspræparat	Farvningsmønster – biopsipræparat	Score (rapport til behandlende læge)	HER2-farvningsvurdering	Klinisk anvendelse
Ingen reaktivitet eller membranøs reaktivitet i < 10 % af tumorcellerne	Ingen reaktivitet eller membranøs reaktivitet i nogen af tumorcellerne	0	HER2-negativ	Ingen
Svag/knapt synlig membranøs reaktivitet i ≥ 10 % af tumorcellerne; cellerne er kun reaktive i en del af deres membran	Tumorcelleklynge* med en svag/knapt synlig membranøs reaktivitet uanset procentdelen af farvede tumorceller	1+	HER2-negativ	
Svag til moderat, fuldstændig baso-lateral eller lateral membranøs reaktivitet i ≥ 10 % af tumorcellerne	Tumorcelleklynge* med en svag til moderat, fuldstændig baso-lateral eller lateral membranøs reaktivitet uanset procentdelen af farvede tumorceller	2+** Reflekstest: HER2 ikke-amplificeret	HER2-negativ	
		2+** Reflekstest: HER2 amplificeret	HER2-positiv/overekspression	HERCEPTIN (trastuzumab)
Kraftig, fuldstændig baso-lateral eller lateral membranøs reaktivitet i ≥ 10 % af tumorcellerne	Tumorcelleklynge* med en kraftig, fuldstændig baso-lateral eller lateral membranøs reaktivitet uanset procentdelen af farvede tumorceller	3+	HER2-positiv/overekspression	

* ≥ 5 kohæsive celler

** Anbefal reflekt til ISH

Farvningsmønster	HER2 (4B5)-score (rapport til behandlende læge)	Anvendelse af farvningsprocedurer i Tab. 2: Anbefalet rapporteringstatus	Klinisk anvendelse
Intens, fuldstændig farvning af membranen i over 10 % af cancercellerne	2+*	HER2-positiv/overekspression	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansin)
	3+	HER2-positiv/overekspression	

* Anbefalet reflekstest til at vurdere genamplifikation i henhold til ASCO/CAP-vejledning

Scoringsregler for fortolkning af VENTANA anti-HER2 (4B5)-antistof i gastrisk karcinom

Gastriske carcinomer, der testes positive for overekspression af HER2-protein, skal opfylde grænsekriterierne for intensitet og mønster af cellemembranfarvning (min. 2+ på en skala fra 0 til 3+) og procentdel af positive tumorceller. Farvning skal lokaliseres til cellemembranen, men behøver ikke være fuldstændig periferisk, da baso-lateral farvning regelmæssigt observeres og bør tages i betragtning ved scoring. Farvning af cytoplasmaet og/eller kernen kan forekomme, men denne farvning er ikke medregnet i bestemmelsen af positivitet. I gastrisk karcinom afhænger procentdelen af positive tumorceller af, om prøven er en biopsiprøve (≥ 5 kohæsive celler) eller en resektionsprøve (≥ 10 %).

Ved etableringen af scoringsretningslinjerne for HER2-immunhistokemi i gastrisk cancer, skal du være opmærksom på, at selvom kraftig membranøs farvning er tegn på HER2-proteinoverekspression i neoplastiske celler, behøver den ikke være helt omkransende.³⁶ I gastrisk cancer er der rapporteret diffus cytoplasmisk farvning med eller uden kernefarvning.³⁷ Ved gastrisk cancer må der kun anvendes membranøs farvning til bestemmelse af HER2-proteinoverekspression.

Immunhistokemisk farvning med klonet 4B5 kan producere cytoplasmisk farvning og kernefarvning af normale gastriske slimhinder og mindre ofte af neoplastiske celler i gastrisk karcinom og GEJ-karcinom (gastroesophageal junction-karcinom). Karakteren af denne cytoplasmiske farvning og kernefarvning er p.t. ukendt. Dette farvningsmønster må ikke forveksles med den diskrete membranøse farvning, da denne er tegn på HER2-positivitet i neoplastiske celler.

Se fortolkningsvejledningen for VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx fortolkningsvejledningen for brystkarcinom og gastrisk karcinom (p/n 1021957DA) for at få flere oplysninger med fotomikrografier af farvning med VENTANA HER2 (4B5)-analyse.

BEGRÆNSNINGER

Generelle begrænsninger

- Immunhistokemi er en diagnosticeringsproces i flere trin, der kræver specialuddannelse i udvælgelsen af de passende reagenser, vævsvalg, fiksering, behandling, klargøring af immunhistokemiske objektglas og fortolkning af farvningsresultaterne.
- Vævsfarvning er afhængig af håndtering og behandling af vævet før farvning. Forkert fiksering, nedfrysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, udskaering eller kontamination med andet væv eller væsker kan fremkalde artefakter, antistofbinding eller falsk negative resultater. Uoverensstemmende resultater kan være et resultat af forskelle i fikserings- og indstøbningsmetoder eller naturlige uregelmæssigheder i selve vævet.
- For kraftig eller ufuldstændig modfarvning kan bringe korrekt fortolkning af resultater i fare.
- Den kliniske fortolkning af en positiv farvning, eller dens fravær, skal evalueres på baggrund af anamnese, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske fortolkning af enhver farvning, eller dens fravær, skal suppleres af morfologiske undersøgelser med korrekte kontroller samt andre diagnostiske tests. Det er en kvalificeret patologs ansvar at være fortrolig med antistoffer, reagenser og metoder, der anvendes til fortolkning af det farvede præparat. Farvning skal udføres i et certificeret, licenseret laboratorium under tilsyn af en patolog, der er ansvarlig for at gennemgå de farvede objektglas og sikre tilstrækkeligheden af positive og negative kontroller.
- VENTANA-antistoffer og -reagenser leveres med optimal fortynding til brug, når de medfølgende instruktioner følges. Enhver afvigelse fra anbefalede testprocedurer kan ugyldiggøre forventede resultater. Passende kontroller skal anvendes og dokumenteres. Brugere, der afviger fra anbefalede testprocedurer, vil være ansvarlige for fortolkningen af patientresultater.
- Dette produkt er ikke beregnet til brug i flowcytometri, da præstationskarakteristika ikke er fastlagt.
- Reagenserne kan fremvise uventede reaktioner i tidligere utestet væv. Muligheden for uventede reaktioner selv i testede vævsgrupper kan ikke helt udelukkes på grund af den biologiske variabilitet i antigenekspressionen i neoplasmer eller andre patologiske væv.³⁸ Kontakt din lokale supportrepræsentant med dokumenterede uventede reaktioner.
- Væv fra personer inficeret med hepatitis B-virus og indeholdende hepatitis B-overfladeantigen (HBsAg) kan udvise uspecifik farvning med peberrodsperoxidase.³⁹
- Falsk positive resultater kan ses på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også være forårsaget af pseudoperoxidaseaktivitet (erythrocytter), endogen peroxidaseaktivitet (cytochrom C) eller endogen biotin (eksempel: lever, hjerne, bryst, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarvning.⁴⁰
- Som ved enhver immunhistokemitest betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev detekteret, og ikke, at antigenet var fraværende i de analyserede celler eller væv.

Specifikke begrænsninger

- Dette antistof er optimeret som beskrevet i Tab. 1 og Tab. 2 for BenchMark-instrumenter og detektionskemi. Afvigelse fra de anbefalede farvningsprotokoller i Tab. 1 og Tab. 2 kan producere uacceptable Negative Reagent Control (NRC)-prøver og VENTANA HER2 (4B5)-analysefarvede prøver med en ændret HER2-score. Øget antistofinkubationstid vil sandsynligvis producere uacceptabel farvning i NRC, hvilket i så fald vil forhindre evaluering af VENTANA HER2 (4B5)-analyseprøven. Reducerede eller forøgede celleforbehandlingstider vil sandsynligvis producere VENTANA HER2 (4B5)-analyseprøver med ændrede HER2-scorer hvilket kan resultere i uhensigtsmæssige beslutninger om patientbehandling. Der henvises til "Immunohistochemistry Principles and Advances" for yderligere information om fikseringsvariable.³³
- Antistoffet i kombination med VENTANA-detektionskits og tilhører detekterer antigen, der overlever rutinemæssig formalinfiksering, vævsbehandling og -udskaering. Brugere, der afviger fra anbefalede testprocedurer, er ansvarlige for fortolkning og validering af patientresultater.
- Objektglassene skal farves straks, da udskaarne vævssnits antigenicitet kan falde over tid og kan blive ødelagt af omgivende faktorer som følge af langvarig opbevaring. Lufttørrede objektglas skal udtørres og opbevares ved 2-8°C. Undersøgelser understøtter antigenstabilitet på ufarvede objektglas i mindst 45 dage. Laboratorier skal godkende udløbsdateringen i deres eget miljø, hvis der ønskes en datering efter 45 dage.

- Knoglemarv blev ikke testet for specificitet. Brugeren skal fastslå passende farvning i ovenstående væv inden fortolkning af farvningsoplysninger.
- Immunhistokemisk farvning med klon 4B5 kan producere cytoplasmisk farvning og kernefarvning af normale gastriske slimhinder og mindre ofte af neoplastiske celler i gastrisk karcinom og karcinom af gastroesophageal junction. Karakteren af denne cytoplasmiske farvning og kernefarvning er p.t. ukendt. Dette farvningsmønster må ikke forveksles med den diskrete membranøse farvning denne er tegn på HER2-positivitet i neoplastiske celler.
- Alle analyser er ikke nødvendigvis registreret på alle instrumenter. Kontakt den lokale Roche-repræsentant for yderligere oplysninger.
- Ændringer i HER2-status er blevet rapporteret til at forekomme med metastatisk progression eller efter neoadjuverende kemoterapi. Baseret på disse observationer kan det eventuelt anbefales at indhente en frisk prøve til bestemmelse af HER2-status på behandlingstidspunktet i stedet for at være afhængig af historisk HER2-status.⁴¹

YDEEVNEKARAKTERISTIKA

Farvningsprøver for sensitivitet, specificitet og præcision blev udført, og resultaterne er anført nedenfor.

ANALYTISK YDEEVNE

Sensitivitet og specificitet

Sensitivitet/specificitet for VENTANA HER2 (4B5)-analyse blev bestemt ud fra en undersøgelse, der ikke viste nogen specifik membranfarvning for de fleste typer normalvæv. Farvningsresultaterne er anført i Tab. 8. Sensitivitet og specificitet for VENTANA HER2 (4B5)-antistof blev også bestemt ud fra en undersøgelse, der ikke viste nogen specifik membranfarvning for de fleste neoplastiske væv. Farvningsresultaterne er anført i Tab. 9. Farvning for sensitivitet og specificitet blev udført ved hjælp af VUE DAB Detection Kit-protokollen på et BenchMark XT-instrument eller ultraView Universal DAB Detection Kit-protokollen på et BenchMark ULTRA-instrumenter.

Positiv farvning i tonsilepitel, spiserørsepitel, prostata, blære, perifer nerve, parathyreoidea, brystkræft, adenokarcinom fra mave-, colon- og ovariecancer stemmer overens med den publicerede litteratur hvad angår ekspresion af HER2.

Tab. 8. Sensitivitet/specificitet for VENTANA HER2 (4B5)-analyse blev fastlagt ved test af normale FFPE-væv.

Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt	Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Cerebrum	0/6	Tyndtarm	0/6
Cerebellum	0/6	Colon	0/46
Binyre	0/6	Lever	0/6
Ovarie	0/6	Spytkirtel	0/3
Pancreas	0/6	Tunge	0/3
Lymfeknude	0/12	Nyre	0/6
Glandula pituitaria	0/5	Prostata	1/6
Testis	0/6	Blære ^b	3/3
Thyreoidea	0/6	Rektum	0/6
Bryst	0/14	Glandula parathyreoidea ^c	4/6
Milt	0/6	Endometrium	0/3
Tonsil ^a	3/6	Uterus	0/3
Thymus	0/5	Cervix	0/5
Knoglemarv	0/3	Endocervix	0/1
Lunge	0/6	Skeletmuskulatur	0/6
Hjerte	0/5	Hud	0/6
Perikardium	0/3	Nerve	2/6

Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt	Væv	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Øsofagus	1/6	Mesothelium	0/3
Mavesæk	0/11	Ikke relevant	Ikke relevant

^a Fokal farvning af epitelcelleoverflader

^b Membranøs farvning af overfladiske paraplyceller

^c fokal membranfarvning

Tab. 9. Sensitivitet/specifitet for VENTANA HER2 (4B5)-analyse blev fastlagt ved test af en række forskellige neoplastiske FFPE-væv.

Patologi	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Glioblastom (cerebrum)	0/2
Meningiom (cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	0/1
Serøst adenokarcinom (ovarie)	0/2
Karcinom, ikke specificeret yderligere (ovarie)	1/2
Neuroendokrint neoplasme (pancreas)	0/1
Adenokarcinom (pancreas)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (pancreas)	0/3
Seminom (testis)	0/1
Embryonalt karcinom (testis)	0/1
Medullært karcinom (thyroidea)	0/1
Papillært karcinom (thyroidea)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (thyroidea)	0/3
Mikroinvasivt duktalt karcinom (bryst)	2/2
Invasivt duktalt karcinom (bryst)	44/98
Karcinom, ikke specificeret yderligere (bryst)	1/4
Småcellet karcinom (lunge)	0/1
Pladecellekarcinom (lunge)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (lunge)	0/2
Adenokarcinom (lunge)	0/1
Pladecellekarcinom (øsofagus)	0/1
Adenokarcinom (øsofagus)	0/1
Mucinøst adenokarcinom (mavesæk)	0/4
Adenokarcinom (mavesæk)	8/88
Signetringcellekarcinom (mavesæk)	0/4
Karcinom, ikke specificeret yderligere (mavesæk)	0/3
Adenokarcinom (tyndtarm)	0/1
Gastrointestinal stromal tumor (tyndtarm)	0/1
Adenokarcinom (colon)	0/32
Gastrointestinal stromal tumor (colon)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (colon)	1/3
Adenokarcinom (rektum)	1/5

Patologi	Antal positive tilfælde / tilfælde i alt
Gastrointestinal stromal tumor (rektum)	0/1
Melanom (rektum)	0/1
Hepatocellulært karcinom (lever)	0/3
Hepatoblastom (lever)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (lever)	0/3
Clear cell-karcinom (nyre)	0/1
Karcinom, ikke specificeret yderligere (nyre)	0/5
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Karcinom, ikke specificeret yderligere (prostata)	0/3
Leiomyom	0/3
Adenokarcinom (uterus)	0/1
Clear cell-karcinom (uterus)	0/1
Pladecellekarcinom (cervix)	0/2
Embryonalt rhabdomyosarkom (tværstribet muskulatur)	0/1
Basalcellekarcinom (hud)	0/1
Pladecellekarcinom (hud)	1/1
Neurofibrom (lumbalt)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mesotheliom (peritoneum)	0/1
Pleomorft rhabdomyosarkom (peritoneum)	0/1
Lymfom, ikke specificeret yderligere	0/3
B-cellelymfom, ikke specificeret yderligere (milt)	0/1
B-cellelymfom, ikke specificeret yderligere (lymfeknude)	0/2
Hodgkin lymfom (lymfeknude)	0/1
Urotelkarcinom (blære)	1/1
Leiomyosarkom (blære)	0/1
Osteosarkom (knogle)	0/1
Leiomyosarkom (glat muskulatur)	0/1
Rektumadenokarcinom (metastatisk)	0/1
Colon-adenokarcinom (metastatisk)	0/7
Mucinøst adenokarcinom i colon (metastatisk)	0/1
Melanom	0/2
Neuroendokrint neoplasme, ikke specificeret yderligere	0/2
Sarkom, ikke specificeret yderligere	0/2
Udifferenteret karcinom, ikke specificeret yderligere	0/1

Analytisk ydeevne i HER2-lav brystkræft

Gentagelighed og mellemprecision for HER2-lav på BenchMark ULTRA 24 tilfælde med brystkarcinom over HER2 IHC-farvningsområdet blev inkluderet i undersøgelsen for gentagelighed og mellemprecision. Undersøgelsens design bekræftede farvningsprecisionen på brystkarcinomvæv farvet med VENTANA HER2 (4B5)-analyse. Tre lots med VENTANA HER2 (4B5)-analyse (mellem antistof-lot) Tre lots med *ultraView* DAB IHC Detection Kits (mellem detektionskit-lot) I løbet af tre dage (mellem dage)

Tre BenchMark ULTRA-instrumenter (mellem instrumenter)

På tværs af alle mellempræcisionsforhold (indenfor samme kørsel)

Hver prøve blev tildelt et typetal baseret på de indsamlede prøver efter testforhold for mellem antistof-lot, mellem detektionskit-lot, mellem instrumenter og mellem dag. For tilstanden indenfor samme kørsel blev hver prøve sammenlignet inden for dets ens prøver pr. testkørsel. Alle objektglas blev blindet og randomiseret og derefter evalueret ved hjælp af kriterierne for intensitet og mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5)-analysefarvning (Tab. 5) Resultaterne er sammenfattet i Tab. 10.

Tab. 10. Gentagelighed og mellemprecision for VENTANA HER2 (4B5)-analyse på brystkræftvæv med HER2-lav scoring

Gentagelighed/ Præcision	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem antistof-lot	PPA	96/96	100.0	(96.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	144/144	100.0	(97.4, 100.0)
Mellem detektion-kit	PPA	93/96	96.9	(92.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	141/144	97.9	(94.4, 100.0)
Mellem instrumenter (BenchMark ULTRA)	PPA	95/96	99.0	(96.7, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	143/144	99.3	(97.9, 100.0)
Mellem dage	PPA	94/96	97.9	(93.3, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	142/144	98.6	(95.8, 100.0)
Indenfor samme kørsel	PPA	142/144	98.6	(96.5, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	214/216	99.1	(97.7, 100.0)

Bemærk: Positiv procentoverensstemmelse (PPA), negativ procentoverensstemmelse (NPA), samlet procentvis overensstemmelse (OPA).

Bemærk: Tosidet 95 %-konfidensinterval (CI) blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 bootstrap-prøver. CI'er for 100 % PPA, NPA og OPA blev beregnet ud fra Wilson-scoringsmetoden.

Bemærk: I følge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til HER2-lav terapi i henhold til designet på det kliniske forsøg, og HER2-score 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til HER2-lav målrettet terapi i henhold til forsøgets design.

Sammenligningsundersøgelse af BenchMark ULTRA med Benchmark XT og Benchmark GX for HER2-lav

Tilfælde med brystkarcinom over HER2 IHC-farvningsområdet blev inkluderet i undersøgelsen for mellemprecision. Undersøgelsens design bekræftede farvningsprecisionen på brystkarcinomvæv farvet med VENTANA HER2 (4B5)-analyse på tværs af flere instrumenter og flere platforme.

Hver prøve blev tildelt et typetal baseret på de indsamlede prøver efter testforhold. Hver prøve blev sammenlignet inden for dets ens prøver pr. testkørsel. Alle objektglas blev blindet og randomiseret og derefter evalueret ved hjælp af kriterierne for intensitet og mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5)-analysefarvning (Tab. 5) Resultaterne er sammenfattet i Tab. 11.

Tab. 11. Gentagelighed og mellemprecision for VENTANA HER2 (4B5)-analyse på brystkræftvæv med HER2-lav scoring

Gentagelighed/ Præcision	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem platforme (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Mellem instrumenter (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mellem instrumenter (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Mellem instrumenter (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Bemærk: Positiv procentoverensstemmelse (PPA), negativ procentoverensstemmelse (NPA), samlet procentvis overensstemmelse (OPA).

Bemærk: Tosidet 95 %-konfidensinterval (CI) blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 bootstrap-prøver. CI'er for 100 % PPA, NPA og OPA blev beregnet ud fra Wilson-scoringsmetoden.

Bemærk: I følge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til HER2-lav terapi i henhold til designet på det kliniske forsøg, og HER2-score 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til HER2-lav målrettet terapi i henhold til forsøgets design.

Læserprecision for HER2-lav på BenchMark ULTRA

Mellem læser- og inden for læserprecision blev vurderet ved at evaluere konkordans for HER2-lav status mellem tre læsere og inden for tre individuelle læsere. Undersøgelsen inkluderede 100 tilfælde med brystkarcinom over HER2 IHC-farvningsområdet. Prøver blev blindet og randomiseret inden evaluering for HER2-lav status i henhold til mønster for cellemembranfarvning med VENTANA HER2 (4B5)-analysefarvning (Tab. 5). Læserne scorede alle præparater to gange, og der var mindst to uger mellem læsningerne. Overensstemmelsen for mellem læser- og inden for læserprecision er sammenfattet i Tab. 12.

Tab. 12. Inden for og mellem læserprecision for VENTANA HER2 (4B5)-analyse med HER2-lav scoring

Præcision	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
For samme læser	APA	312/333	93.7	(90.9, 96.4)
	ANA	246/267	92.1	(88.0, 95.6)
	OPA	279/300	93.0	(90.0, 96.0)
Fra læser til læser	APA	300/332	90.4	(85.8, 94.3)
	ANA	236/268	88.1	(82.1, 93.0)
	OPA	268/300	89.3	(84.7, 94.0)

Præcision	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI

Bemærk: Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA), gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA), samlet procentvis overensstemmelse (OPA).

Bemærk: Tosidet 95 %-konfidensinterval (CI) blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 bootstrap-prøver.

Bemærk: I følge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til HER2-lav terapi i henhold til designet på det kliniske forsøg, og HER2-score 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til HER2-lav målrettet terapi i henhold til forsøgets design.

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier for HER2-lav på BenchMark ULTRA

En undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier for VENTANA HER2 (4B5)-analysen blev fuldført for at påvise analysens reproducerbarhed med henblik på bestemmelse af HER2-lav status for tilfælde med brystkarcinom. Undersøgelsen omfattede 28 afidentificerede, arkiverede FFPE-brystkarcinomvævspræparater, der blev kørt på tre forskellige BenchMark ULTRA-instrumenter på fem ikke-fortløbende dage i løbet af 20 dage på tre eksterne laboratorier. Prøverne repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 (4B5)-analysen.

Hvert sæt med 5 farvede objektglas pr. prøve pr. farvningsdag blev randomiseret og evalueret af i alt 6 læsere (2 læsere pr. laboratorie) med henblik på en HER2-lav status. HER2-lav statusresultaterne for alle læsere, laboratorier og dage for prøverne blev kombineret og analyseret i forhold til læsertypetallene for de samme prøver med henblik på at bestemme den samlede reproducerbarhed af HER2-lav statussen. Sammenfatningen af overensstemmelsesraterne for alle evaluerbare observationer, hvor aflæsningsstilstandene på prøveniveau for HER2-lav-status blev anvendt som reference, kan findes i Tab. 13.

Tab. 13. Reproducerbarhed mellem laboratorier for samlede overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analyse med HER2-lav scoring

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Samlet	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
Inden for laboratorium	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
For samme læser	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)

Bemærk: Positiv procentoverensstemmelse (PPA), negativ procentoverensstemmelse (NPA), samlet procentvis overensstemmelse (OPA).

Bemærk: Tosidete 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til HER2-lav terapi i henhold til designet på det kliniske forsøg, og HER2-score 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til HER2-lav målrettet terapi i henhold til forsøgets design.

Derudover blev der foretaget parvise sammenligninger mellem centre, mellem læsere og mellem dage for HER2-lav-status. Der findes et sammendrag af resultaterne i Tab. 14. Dataene indikerer reproducerbarhed af analysen på 5 forskellige dage, 3 centre og 6 læsere.

Tab. 14. Reproducerbarhed mellem laboratorier for parvise overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analysen med HER2-lav scoring

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre	APA	7884/8102	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	8240/8458	97.4	(95.7, 98.8)
	OPA	8062/8280	97.4	(95.5, 98.8)
Fra læser til læser	APA	398/409	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	414/425	97.4	(95.6, 98.8)
	OPA	406/417	97.4	(95.5, 98.8)
Mellem dage	APA	1580/1620	97.5	(95.9, 98.9)
	ANA	1652/1692	97.6	(96.2, 98.9)
	OPA	1616/1656	97.6	(96.1, 98.9)

Bemærk: Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA), gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA), samlet procentvis overensstemmelse (OPA)

Bemærk: Tosidete 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas

Bemærk: I følge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til HER2-lav terapi i henhold til designet på det kliniske forsøg, og HER2-score 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til HER2-lav målrettet terapi i henhold til forsøgets design.

Analytisk ydeevne i HER2-lav brystkræfttilfælde

Konkordans mellem BenchMark ULTRA- og BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter for HER2-lav

Tre laboratorier deltog i undersøgelsen af konkordans for at evaluere ydeevnen mellem BenchMark ULTRA-instrumentet og BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. Med henblik på statistisk analyse af HER2-lav blev 160 (80 positive og 80 negative, inklusive 16 grænsetilfælde) af tilfældene på forhånd udvalgt til analyse forud for patologlæsninger. Objektglas fra alle tilfælde blev farvet med negativ reagenskontrol samt VENTANA HER2 (4B5)-analyse på et internt Roche-laboratorie på et BenchMark ULTRA-instrument ved hjælp af den anbefalede farvningsprotokol. Ufarvede objektglas med væv fra alle tilfælde blev randomiseret og ligeligt fordelt med henblik på farvning på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved brug af den anbefalede VENTANA HER2 (4B5)-farvningsprotokol. Blindet for sagsstatus læste én læser på hvert anlæg de BenchMark ULTRA PLUS-farvede objektglas fra deres anlæg og bestemte HER2 (4B5)-statussen. Resultaterne blev analyseret af Roche. Resultaterne er sammenfattet i Tab. 15.

Tab. 15. Poollet overensstemmelse af HER2-lav status for tilfælde farvet med VENTANA HER2 (4B5) på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-læser = positiv, eksternt læser = positiv	Roche-læser = positiv, eksternt læser = negativ	Roche-læser = negativ, eksternt læser = positiv	Roche-læser = negativ, eksternt læser = negativ	I alt
Positive	272	13	25	11	321
Negativ	8	9	2	298	317
I alt	280	22	27	309	638
Positivprocent % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	Ikke relevant
	n/N		% (95 % CI)		

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-læser = positiv, ekstern læser = positiv	Roche-læser = positiv, ekstern læser = negativ	Roche-læser = negativ, ekstern læser = positiv	Roche-læser = negativ, ekstern læser = negativ	I alt
PPA	285/302		94.4 (91.6, 96.8)		
NPA	300/336		89.3 (84.3, 94.4)		
OPA	585/638		91.7 (88.5, 94.6)		

Bemærk: PPA = positiv procentoverensstemmelse, NPA = negativ procentoverensstemmelse, OPA = samlet procentvis overensstemmelse.

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter IHC-kvalifikationsscoresortering.

Bemærk: Den poolede overensstemmelse indeholdt alle tilfælde og alle ULTRA PLUS-læsere.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til det kliniske forsøg, der undersøgte HER2-lav brystkræft. HER2-scoring 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til det kliniske forsøg.

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier på BenchMark ULTRA PLUS for HER2-lav

En undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier for VENTANA HER2 (4B5)-analysen blev fuldført for at påvise analysens reproducerbarhed med henblik på bestemmelse af HER2-lav status for tilfælde med brystcarcinom.

Undersøgelsen omfattede 28 afidentificerede, arkiverede FFPE-brystkarcinomvævspræparater, der blev kørt på tre forskellige BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter på fem ikke-fortløbende dage i løbet af 20 dage på tre eksterne laboratorier. Prøverne repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 (4B5)-analysen.

Hvert sæt med 5 farvede objektglas pr. prøve pr. farvningsdag blev randomiseret og evalueret af i alt 6 læsere (2 læsere pr. anlæg) med henblik på en HER2-lav status. HER2-lav statusresultaterne for alle læsere, laboratorier og dage for prøverne blev kombineret og analyseret i forhold til læsertypetallene for de samme prøver med henblik på at bestemme den samlede reproducerbarhed af HER2-lav statussen. Sammenfatningen af overensstemmelsesraterne for alle evaluerbare observationer, hvor aflæsningstilstandene på prøveniveau for HER2-lav-status blev anvendt som reference, kan findes i Tab. 16.

Tab. 16. Reproducerbarhed mellem laboratorier for samlede overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analyse i brystcarcinom med HER2-lav scoring.

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Primær analyse/samlet	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Stratificeret efter laboratorie	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Stratificeret efter læser	PPA	412/425	96.9	(94.8, 98.7)
	NPA	405/415	97.6	(94.9, 100.0)
	OPA	817/840	97.3	(95.2, 98.9)

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter kvalifikationsscoresortering for tilfælde.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til det kliniske forsøg, der undersøgte HER2-lav brystkræft. HER2-scoring 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til det kliniske forsøg.

Derudover blev der foretaget parvise sammenligninger af HER2 (4B5)-status mellem laboratorier, læsere og dage. Som opsummeret i Tab. 17 var analysen reproducerbar på 5 forskellige dage, 3 laboratorier og 6 læsere.

Tab. 17. Reproducerbarhed mellem laboratorier for parvise overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analyse i brystcarcinom med HER2-lav scoring.

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre	APA	7982/8440	94.6	(90.3, 97.9)
	ANA	7902/8360	94.5	(90.6, 98.0)
	OPA	7942/8400	94.5	(90.5, 98.0)
Fra læser til læser	APA	402/422	95.3	(91.7, 98.1)
	ANA	398/418	95.2	(91.8, 98.1)
	OPA	400/420	95.2	(91.9, 98.1)
Mellem dage	APA	1608/1688	95.3	(91.5, 98.2)
	ANA	1592/1672	95.2	(91.8, 98.2)
	OPA	1600/1680	95.2	(91.8, 98.2)

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter kvalifikationsscoresortering for tilfælde.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2-score 0 og 3+ grupperet sammen som negative tilfælde, da de var uegnede til det kliniske forsøg, der undersøgte HER2-lav brystkræft. HER2-scoring 1+ og 2+ blev grupperet sammen som positive tilfælde, da de var egnede eller potentielt egnede til det kliniske forsøg.

Analytisk ydeevne i HER2-positiv brystkræfttilfælde

Konkordans mellem BenchMark ULTRA- og BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter for HER2-positiv

Tre laboratorier deltog i undersøgelsen af konkordans for at evaluere ydeevnen mellem BenchMark ULTRA-instrumentet og BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. Ved en HER2-positiv analyse er en HER2 IHC-score på 2+ eller 3+ defineret som HER2-positiv, og en score på 0 eller 1+ er defineret som HER2-negativ. Med henblik på statistisk analyse af HER2-positiv blev 160 (80 positive og 80 negative, inklusive 16 grænsetilfælde) af tilfældene på forhånd udvalgt til analyse forud for patologilæsninger. Objektglas fra alle tilfælde blev farvet med negativ reagenskontrol samt VENTANA HER2 (4B5)-analyse på et internt Roche-laboratorie på et BenchMark ULTRA-instrument ved hjælp af den anbefalede farvningsprotokol. Ufarvede objektglas med væv fra alle tilfælde blev randomiseret og ligeligt fordelt med henblik på farvning på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved brug af den anbefalede VENTANA HER2 (4B5)-farvningsprotokol. Blindet for sagsstatus læste én læser på hvert anlæg de BenchMark ULTRA PLUS-farvede objektglas fra deres anlæg og bestemte HER2 (4B5)-statussen. Resultaterne blev analyseret af Roche. Resultaterne er sammenfattet i Tab. 18.

Tab. 18. Poolet overensstemmelse af HER2-positiv status for tilfælde farvet med VENTANA HER2 (4B5) på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-læser = positiv, ekstern læser = positiv	Roche-læser = positiv, ekstern læser = negativ	Roche-læser = negativ, ekstern læser = positiv	Roche-læser = negativ, ekstern læser = negativ	I alt
Positive	245	18	11	13	287
Negativ	6	13	5	327	351
I alt	251	31	16	340	638
Positivprocent % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	Ikke relevant
	n/N		% (95 % CI)		
PPA	(263/282)		93.3 (89.3, 96.6)		
NPA	(332/356)		93.3 (89.7, 96.5)		
OPA	(595/638)		93.3 (90.8, 95.6)		

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter IHC-kvalifikationsscoregruppe (0, 1+, 2+, 3+).

Bemærk: Den poolede overensstemmelse indeholdt alle tilfælde og alle ULTRA PLUS-læsere.

Bemærk: PPA = positiv procentoverensstemmelse, NPA = negativ procentoverensstemmelse, OPA = samlet procentvis overensstemmelse.

Undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier på BenchMark ULTRA PLUS for HER2-positiv

En undersøgelse af reproducerbarhed mellem laboratorier for VENTANA HER2 (4B5)-analysen blev fuldført for at påvise analysens reproducerbarhed med henblik på bestemmelse af HER2-positiv status for tilfælde med brystkarcinom. Undersøgelsen omfattede 28 afidentificerede, arkiverede FFPE-brystkarcinomvævspræparater, der blev kørt på tre forskellige BenchMark ULTRA PLUS-instrumenter på fem ikke-fortløbende dage i løbet af 20 dage på tre eksterne laboratorier. Prøverne repræsenterede farvningsområdet for VENTANA HER2 (4B5)-analysen.

Hvert sæt med 5 farvede objektglas pr. prøve pr. farvningsdag blev randomiseret og evalueret af i alt 6 læsere (2 læsere pr. anlæg) med henblik på en HER2-positiv status. HER2-positiv statusresultaterne for alle læsere, laboratorier og dage for prøverne blev kombineret og analyseret i forhold til læsertypetallene for de samme prøver med henblik på at bestemme den samlede reproducerbarhed af HER2-positiv statussen. Sammenfatningen af overensstemmelsesraterne for alle evaluerbare observationer, hvor aflæsningstilstandene på prøveniveau for HER2-positiv-status blev anvendt som reference, kan findes i Tab. 19.

Tab. 19. Reproducerbarhed mellem laboratorier for samlede overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analyse i brystkarcinom med HER2-positiv scoring.

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Primær analyse/samlet	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Stratificeret efter laboratorie	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Stratificeret efter læser	PPA	413/420	98.3	(96.9, 99.5)
	NPA	412/420	98.1	(95.8, 100.0)
	OPA	825/840	98.2	(96.9, 99.4)

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter kvalifikationsscoresortering for tilfælde.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2 IHC-score 0 og 1+ grupperet sammen som negative, og HER2 IHC-score 2+ og 3+ blev grupperet sammen som positive.

Derudover blev der foretaget parvise sammenligninger af HER2 (4B5)-status mellem laboratorier, læsere og dage. Som opsummeret i Tab. 20 var analysen reproducerbar på 5 forskellige dage, 3 laboratorier og 6 læsere.

Tab. 20. Reproducerbarhed mellem laboratorier for parvise overensstemmelsesrater for VENTANA HER2 (4B5)-analyse i brystkarcinom med HER2-positiv farvning.

Reproducerbarhed mellem laboratorier	Overensstemmelse			
	Type	n/N	%	95 % CI
Mellem forskellige centre	APA	8074/8420	95.9	(92.8, 98.6)
	ANA	8034/8380	95.9	(92.5, 98.7)
	OPA	8054/8400	95.9	(92.7, 98.6)
Fra læser til læser	APA	402/421	95.5	(92.0, 98.6)
	ANA	400/419	95.5	(91.6, 98.6)
	OPA	401/420	95.5	(91.9, 98.6)
Mellem dage	APA	1634/1684	97.0	(95.0, 98.9)
	ANA	1626/1676	97.0	(94.8, 98.9)
	OPA	1630/1680	97.0	(95.0, 98.9)

Bemærk: Tosidede 95 %-CI'er blev beregnet med percentil-bootstrap-metoden ud fra 2000 ens objektglas stratificeret efter kvalifikationsscoresortering for tilfælde.

Bemærk: Ifølge hensigten med undersøgelsesanalysen blev HER2 IHC-score 0 og 1+ grupperet sammen som negative, og HER2 IHC-score 2+ og 3+ blev grupperet sammen som positive.

Præstationskarakteristika på BenchMark ULTRA-instrument ved brug af iVIEW DAB Detection Kit eller **ultraView** Universal DAB Detection Kit

BenchMark ULTRA-instrumentets farvning mellem laboratorier og farvning på forskellige dage: Tre laboratorier i forskellige institutioner i USA deltog i undersøgelsen af reproducerbarhed mellem laboratorier. Udskårne snit af 48 tilfælde af invasive FFPE-brystkarcinomtillfælde [12 hver fra hver HER2-sorteringskategori (0, 1+, 2+, 3+)] og 1 par PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides pr. hver af de 12 farvningskørsler blev sendt til farvning på laboratorierne med et BenchMark ULTRA-instrument og den anbefalede farvningsprotokol og **ultraView** Universal DAB Detection Kit. Kontrollerne inkluderede PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andet objektglas med hvert tilfælde, der var farvet med negativ Ig-reagens. Patologer, der ikke kendte vævssnittets status, evaluerede og scorede objektglassene (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultaterne blev analyseret af Ventana. Ud fra standardnomenklaturen for 2x2-tabeller blev den gennemsnitlige positive overensstemmelse (APA) på alle laboratorier beregnet $[2a/(2a+b+c)]$, mens den gennemsnitlige negative overensstemmelse (ANA) blev beregnet $[2d/(2d+b+c)]$. APA mellem laboratorier baseret på klinisk vurdering (positiv/negativ) var 90.0 % (108/120) på alle laboratorier, mens ANA var 92.9 % (156/168). Ved de parvise sammenligninger af laboratorierne blev APA beregnet til $a/(a+c)$, mens ANA blev beregnet $d/(b+d)$. APA

mellem laboratorierne var 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) og 89.5 % (34/38) mellem henholdsvis laboratorie A og B; A og C; og B og C. ANA mellem laboratorierne var 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) og 93.1 % (54/58) mellem henholdsvis laboratorie A og B; A og C; og B og C.

Tabellerne nedenfor er 3x3-præsentationer af resultaterne for hver læser baseret på den kliniske score, hvor 2+ og 3+ er adskilt.

Tab. 21. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem laboratorie A og B – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Forsøgscenter A	Forsøgscenter B			
	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
I alt	12	9	27	48
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA): n/N (95 % CI) 43/48 (89.6) (77.8-95.5)				

Tab. 22. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem laboratorie A og C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Forsøgscenter A	Forsøgscenter C			
	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
I alt	12	5	31	48
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA): n/N (95 % CI) 42/48 (87.5) (75.3-94.1)				

Tab. 23. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem laboratorie B og C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Forsøgscenter B	Forsøgscenter C			
	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
I alt	12	5	31	48
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA): n/N (95 % CI) 44/48 (91.7) (80.4-96.7)				

Reproducerbarhed af farvning mellem dage for BenchMark ULTRA-instrument

Undersøgelsens andel af reproducerbarhed mellem dage (IDR) udgjorde 12 tilfælde med en tilsigtet fordeling på cirka 3 (tre) tilfælde pr. klinisk score (0, 1+, 2+, 3+). Samlet set blev de fem kørsler på BenchMark ULTRA-instrumentet på det ene laboratorie (C), der udførte IDR-andelen af undersøgelsen, udført i løbet af minimum 20 dage, således at der ikke forekom to på hinanden følgende farvningsdage. IDR APA- og ANA-frekvenserne baseret på klinisk vurdering af klon 4B5-farvning på Center C målt på alle dage var begge 100 %. Den samlede procentvis overensstemmelse (OPA) for sammenligningerne mellem dage og baseret på kliniske scoringer var 100 % for hver dag til dag-sammenligning og for alle dage tilsammen.

Sammenligningsundersøgelse af BenchMark ULTRA- og BenchMark XT-instrumenterne

To farvningslaboratorier og tre aflæsningssteder i USA deltog i den komparative platformsundersøgelse. Udskårne FFPE-vævssnit af 280 tilfælde af invasiv brystkarcinom [cirka 70 tilfælde fra hver HER2-sorteringskategori (0, 1+, 2+, 3+)] blev fordelt tilfældigt mellem to farvningslaboratorier (140 tilfælde pr. anlæg) for farvning på et BenchMark XT- og et BenchMark ULTRA-instrument med de anbefalede farvningsprotokoller og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerne inkluderede PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andet objektglas med hvert tilfælde, der var farvet med negativ Ig-reagens. Tilfælde med farvning fra laboratorie 1 og 2 blev derefter opdelt i fire sæt af objektglas og leveret ét sæt ad gangen til tre forskellige kvalificerede læsere (patologer), en læser på laboratorie 1, en på laboratorie 2 og en på laboratorie 3. Patologerne kendte hverken tilfældets status eller farvningsplatformen. De evaluerede alle fire sæt af objektglas og gav en klinisk score (dvs. 0, 1+, 2+, 3+) for hvert tilfælde. Resultaterne blev analyseret af Ventana. PPA-raterne (og de nederst bundne af de tosidede 95 %-konfidensintervaller) for klon 4B5-antistoffarvning på BenchMark ULTRA-instrumentet versus BenchMark XT-instrumentet baseret på positiv versus negativ klinisk vurdering var henholdsvis 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) og 94.9 % (89.3) for henholdsvis læser A, B og C. NPA-raterne (og de nederst bundne af de tosidede 95 %-konfidensintervaller) for klon 4B5-antistoffarvning på BenchMark ULTRA-instrumentet versus BenchMark XT-instrumentet baseret på positiv versus negativ klinisk vurdering var henholdsvis 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) og 99.3 % (96.3) for henholdsvis læser A, B og C. OPA mellem klon 4B5-farvning ved brug af BenchMark ULTRA-instrumentet versus BenchMark XT-instrumentet baseret på 2x2-analyse af klinisk vurdering (positiv eller negativ) var 91.8 %, 92.5 % og 97.4 % ifølge henholdsvis læser A, B og C. 3x3-præsentation af raterne for overensstemmelse mellem platforme for hver læser baseret på klinisk score (0/1+, 2+, 3+) fremgår af nedenstående tabeller:

Tab. 24. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme, BenchMark ULTRA versus BenchMark XT – læser A.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Læser A	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
I alt	96	47	124	267
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (95 % CI) 226/267 (84.6) (79.8-88.5)				

Tab. 25. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme, BenchMark ULTRA versus BenchMark XT – læser B.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Læser B	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
I alt	69	68	130	267
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (95 % CI) 242/267 (90.6) (86.5-93.6)				

Tab. 26. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme, BenchMark ULTRA versus BenchMark XT – læser C.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Læser C	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Læser C	3+	2+	0, 1+	I alt
0, 1+	0	6	148	154
I alt	66	52	149	267
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (%) 257/267 (96.3) (93.2-98.0) (95 % CI)				

Reproducerbarhed mellem patologer for præparater i komparativ instrumentundersøgelse

Positive og negative overensstemmelsesrater med tosidede 95 %-konfidensintervaller blev beregnet for de seks potentielt parvis sammenligninger mellem læsere for hver platform.

PPA-raterne for BenchMark ULTRA-instrumentet for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) og 83.5 % (111/133). NPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) og 98.5 % (132/134). OPA-raten var højest mellem læser A og læser B (91.8 %) og lavere mellem læser B og læser C (91.0 %) og mellem læser A og læser C (88.8 %).

PPA-raterne for BenchMark XT-instrumentet for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) og 84.7 % (116/137). NPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) og 98.5 % (128/130). OPA-raten var højest mellem læser A og læser B (92.5 %) og lavere mellem læser B og læser C (91.4 %) og mellem læser A og læser C (89.1 %).

Komparativ undersøgelse af iVIEW DAB Detection Kit og *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Anlæg 1's kohorte af 140 FFPE-vævsnit med tilfælde af invasivt brystkarcinom [cirka 35 tilfælde fra hver HER-2-sorteringskategori (0, 1+, 2+, 3+)] indgik i en komparativ undersøgelse af iVIEW DAB Detection Kit og *ultraView* Universal DAB Detection Kit ved farvning med klon 4B5 på BenchMark ULTRA-instrumentet. Et enkelt farvningslaboratorium og tre aflæsningssteder i USA deltog i detektionssammenligningsundersøgelsen. PPA-raterne mellem resultaterne for klon 4B5-antistoffarvning på BenchMark ULTRA-instrumentet, der blev indsamlet med iVIEW DAB Detection Kit- og *ultraView* Universal DAB Detection Kit-metoder baseret på kliniske vurderinger (positive/negative), var 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) og 96.5 % (55/57) for henholdsvis læser A, B og C, og NPA-raterne mellem detektionsmetoderne var 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) og 97.5 % (77/79) for henholdsvis læser A, B og C. OPA-raterne mellem detektionskit var 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) og 97.1 % (132/136) for henholdsvis A, B og C. 3x3-præsentation af overensstemmelsesraterne for detektionssammenligning for hver læser baseret på klinisk score (0/1+, 2+, 3+) fremgår af nedenstående tabeller

Tab. 27. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater for læser A, iVIEW DAB Detection Kit versus *ultraView* Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-farvning på BenchMark ULTRA-instrument.

iVIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Læser A	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
I alt	46	25	65	136
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (%) 119/136 (87.5) (80.9-92.0) (95 % CI)				

Tab. 28. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater for læser B, iVIEW DAB Detection Kit versus *ultraView* Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-farvning på BenchMark ULTRA-instrument.

iVIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Læser B	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
I alt	33	32	71	136
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (%) 128/136 (94.1) (88.8-97.0) (95 % CI)				

Tab. 29. 3x3-analyse af overensstemmelsesrater for læser C, iVIEW DAB Detection Kit versus *ultraView* Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-farvning på BenchMark ULTRA-instrument.

iVIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Læser C	3+	2+	0, 1+	I alt
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
I alt	32	25	79	136
Samlet procentvis overensstemmelse: n/N (%) 132/136 (97.1) (92.7-98.9) (95 % CI)				

Reproducerbarhed mellem patologer for præparater i komparativ detektionsundersøgelse:

Positive og negative overensstemmelsesrater med tosidede 95 %-konfidensintervaller blev beregnet for de seks potentielt parvis sammenligninger mellem læsere for hver metode.

For iVIEW DAB Detection Kit, PPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) og 79.7 % (55/69). NPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) og 97.0 % (65/67). OPA-raten var højest mellem læser A og læser B (96.3 %) og lavere mellem læser A og læser C (86.0 %) og mellem læser B og læser C (88.2 %).

For *ultraView* Universal DAB Detection Kit var PPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B henholdsvis 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) og 86.2 % (56/65). NPA-raterne for læser A versus B, A versus C, B versus C, B versus A, C versus A og C versus B var henholdsvis 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) og 98.6 % (70/71). Den samlede procentoverensstemmelse mindede om hvert par af læsere, 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) og 92.6 % (126/136) for henholdsvis læser A versus B, A versus C og B versus C.

Analytisk ydeevne i tilfælde af gastrisk cancer

Præcisionsundersøgelser af BenchMark ULTRA- og BenchMark XT-instrumentet: Gentageligheden mellem kørsler på BenchMark XT-instrumentet blev undersøgt i fem kørsler over en periode på 5 dage (ikke sammenhængende). Fem objektglas indeholdende tre vævsnit af gastrisk væv med scorerne 0, 1+, 2+ og 3+ for HER2-ekspression demonstrerede 100 % overensstemmelse inden for den positive/negative værdi for hvert væv.

Gentageligheden inden for samme kørsel på BenchMark XT-instrumentet blev undersøgt på 28 objektglas indeholdende tre vævsnit af gastrisk væv med scorerne 0, 1+, 2+ og 3+ for HER2-ekspression. Alle tilfældene scorede ækvivalent inden for den positive/negative værdi for hver vævstype.

Gentageligheden inden for samme platform blev undersøgt på tre forskellige BenchMark XT-instrumenter. I disse kørsler scorede alle 30 objektglas fra hver af de to multivævsblokke indeholdende tre vævssnit af gastrisk væv med scorerne 0, 1+, 2+ og 3+ for HER2-ekspression ækvivalent inden for den positive/negative værdi for hver vævstype.

Gentageligheden inden for samme platform blev testet på tre BenchMark ULTRA-instrumenter. I disse kørsler scorede alle 15 objektglas fra én multivævsblok ækvivalent inden for den positive/negative værdi for hver vævstype.

Gentageligheden mellem platforme blev testet på tre BenchMark XT- og tre BenchMark ULTRA-instrumenter. I disse kørsler scorede alle 30 objektglas fra én multivævsblok ækvivalent inden for den positive/negative værdi for hver vævstype.

Sammenligning af iVIEW DAB Detection Kit og **ultraView** Universal DAB Detection Kit ved brug af tilfælde af gastrisk cancer

Klon 4B5 blev anvendt til at udføre sammenligningstest af detektionskit på to forskellige instrumenter (BenchMark XT og BenchMark ULTRA-instrumenter) ved brug af iVIEW DAB Detection Kit og **ultraView** Universal DAB Detection Kit. Tohundredeogti vævstilfælde blev brugt som en del af testen. De farvede objektglas blev evalueret for positiv/negativ klinisk scoring.

Morfologien og baggrundsacceptkriterierne var 100 % for både detektionskits og instrumenter. Direkte sammenligninger for positiv og negativ klinisk vurdering mellem detektionskits for hvert instrument fremgår af nedenstående tabeller.

Tab. 30. Klinisk vurdering for **ultraView** Universal DAB Detection Kit versus iVIEW DAB Detection Kit på BenchMark XT-instrumentet.

ultraView Universal DAB Detection Kit	iVIEW DAB Detection Kit		
	Positive	Negative	I alt
Positive	21	0	21
Negativ	0	189	189
I alt	21	189	210
	n/n	% (95 % CI)	
Positiv procentoverensstemmelse	21/21	100 (84.5-100)	
Negativ procentoverensstemmelse	189/189	100 (98.0-100)	
Samlet procentvis overensstemmelse	210/210	100 (98.2-100)	

Tab. 31. Sammenligning af klinisk vurdering på BenchMark XT- og BenchMark ULTRA-instrumenter ved brug af **ultraView** Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT-instrument med ultraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA-instrument med ultraView Universal DAB Detection Kit		
	Positive	Negative	I alt
Positive	20	1	21
Negativ	0	189	189
I alt	20	190	210
	n/N	% (95 % CI)	
Positiv procentoverensstemmelse	20/20	100 (83.9-100)	
Negativ procentoverensstemmelse	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Samlet procentvis overensstemmelse	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

Reproducerbarhed mellem laboratorier for klon 4B5 i gastrisk karcinom:

Undersøgelsen blev udført på tre testlaboratorier. Prøver blev udvalgt til inklusion i undersøgelsen baseret på den kliniske IHC-score for klon 4B5 IHC, således at der var ca. samme antal positive (3+) og negative (0, 1+) vævssnit. Der blev desuden undersøgt op til fire vævssnit af 2+ kvalificerede vævssnit med gastrisk cancer.

De tre laboratorier brugte alle et BenchMark XT-instrument og et BenchMark ULTRA-instrument til at føre fire farvekørsler pr. instrument. Vævssnittene blev randomiseret til farvning ved brug af en stratificeret randomiseringsprocedure, som tildelte vævssnit, så hver kørsel indeholdt vævssnit med alle scoringskategorier for HER2 i gastrisk cancer. Kørslerne på hvert instrument på hvert laboratorium indeholdt de samme vævssnit. På hvert laboratorium blev ét objektglas fra hvert vævssnit farvet med klon 4B5, og et andet objektglas fra samme vævssnit blev farvet med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig på BenchMark ULTRA-instrumentet. På hvert forsøgscenter blev der på samme måde farvet et andet par objektglas fra samme tilfælde på BenchMark XT-instrumentet. Objektglassene med vævssnit blev bedømt af en kvalificeret læser på hvert laboratorium blindet for tidligere bestemte kliniske IHC-scoringer for hver prøve.

Den samlede overensstemmelse for alle evaluerbare vævssnit var 100 % for alle tre sammenligninger mellem laboratorier på både BenchMark ULTRA-instrumentet og BenchMark XT-instrumentet. Den samlede overensstemmelse mellem BenchMark ULTRA-instrumentet og BenchMark XT-instrumentet for evaluerbare vævssnit var 100 % på hvert af de tre laboratorier. Raterne for baggrundsacceptabilitet og morfologisk acceptabilitet for alle vævssnit var 100 % for begge instrumenter på laboratorierne A og C og > 95 % for begge instrumenter på laboratorium B. Se nedenstående tabeller.

Tab. 32. Samlet overensstemmelse mellem klinisk vurdering mellem laboratorier: gastrisk karcinom, alle evaluerbare vævssnit.

BenchMark ULTRA-instrument	Samlet procentvis overensstemmelse (positive og negative tilfælde)	Samlet procentvis overensstemmelse (inklusive tvetydige tilfælde)
Laboratorie A sammenlignet med laboratorie B: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100%) (88.6 – 100)	38/42 (90.5%) (77.9 – 96.2)
Laboratorie A sammenlignet med laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100%) (88.6 – 100)	35/42 (83.3%) (69.4 – 91.7)
Laboratorie B sammenlignet med laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100%) (88.6 – 100)	31/42 (73.8%) (58.9 – 84.7)
BenchMark XT-instrument	Samlet procentvis overensstemmelse (positive og negative tilfælde)	Samlet procentvis overensstemmelse (inklusive tvetydige tilfælde)
Laboratorie A sammenlignet med laboratorie B: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100%) (89.0 – 100.0)	36/43 (83.7%) (70.0 – 91.9)
Laboratorie A sammenlignet med laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100%) (89.0 – 100.0)	36/43 (83.7%) (70.0 – 91.9)
Laboratorie B sammenlignet med laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100%) (89.0 – 100.0)	35/43 (81.4%) (67.4 – 90.3)

Tab. 33. Samlet overensstemmelse mellem klinisk vurdering mellem platforme: gastrisk karcinom alle evaluerbare vævssnit.

BenchMark ULTRA-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument	Samlet procentvis overensstemmelse (positive og negative tilfælde)	Samlet procentvis overensstemmelse (inklusive tvetydige tilfælde)
Laboratorie A: n/N (%) (95 % CI)	40/40 (100%) (91.2-100)	42/44 (95.5%) (84.9 – 98.7)
Laboratorie B: n/N (%) (95 % CI)	34/34 (100%) (89.8 – 100)	37/42 (88.1%) (75.0 – 94.8)
Laboratorie C: n/N (%) (95 % CI)	32/32 (100%) (89.3 – 100)	38/44 (86.4%) (73.3 – 93.6)

Tab. 34. Rater for baggrundsacceptabilitet og morfologisk acceptabilitet: gastrisk karcinom, alle vævssnit

BenchMark ULTRA-instrument	Forsøgscenter A	Forsøgscenter B	Forsøgscenter C
Rater for morfologisk acceptabilitet	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Rater for baggrundsfarvningsacceptabilitet	44/44 (100%)	42/44 (95.5%)	44/44 (100%)
Rater for morfologisk acceptabilitet	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Rater for baggrundsfarvningsacceptabilitet	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)

Sammenligningsundersøgelse af BenchMark-instrument og BenchMark GX-instrument i forhold til BenchMark XT-instrument: Gastrisk karcinom
Objektglas med udsikring af 3 TMA'er indeholdende FFPE-vævssnit med tilfælde af gastrisk karcinom [ca. 50 vævssnit pr. TMA] blev farvet på et BenchMark XT-instrument, et BenchMark-instrument og et BenchMark GX-instrument ved brug af de respektive anbefalede farvningsprotokoller for *ultraView* Universal DAB Detection Kit og *iVIEW* DAB Detection Kit. Kontrollerne inkluderede PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andet objektglas med hvert TMA farvet med negativ Ig-reagens. Farvede objektglas blev bedømt af en læser (en patolog).

De samlede overensstemmelsesrater (og de nederst bundne af de tosidede 95 %-konfidensintervaller) for klon 4B5-antistoffarvning baseret på klinisk vurdering (positiv, negativ) var som følger: BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.0 % (94.2-99.3), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97.4 % (93.6-99.0), BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 96.6 % (92.7-98.4), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 95.9 % (91.8-98.0).

De positive overensstemmelsesrater (og de nederst bundne af de tosidede 95 %-konfidensintervaller) for klon 4B5-antistoffarvning baseret på klinisk vurdering (positiv, negativ) var som følger: BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91.7 % (64.4-98.5), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78.6 % (52.4-92.4), BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 80.0 % (54.8-93.0), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 73.3 % (48.0-89.1).

De negative overensstemmelsesrater (og de nederst bundne af de tosidede 95 %-konfidensintervaller) for klon 4B5-farvning baseret på klinisk vurdering (positiv, negativ) var som følger: BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8-99.6), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1-99.9), BenchMark-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.6-99.4), BenchMark GX-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet med *iVIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.5-99.3). 2x2-præsentationen af overensstemmelsesraterne for hver sammenligning baseret på klinisk vurdering (positiv, negativ) er vist i tabellerne nedenfor.

Tab. 35. 2x2-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme for BenchMark-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit: gastrisk karcinom.

Clone 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
Positive	11	2	13
Negativ	1	133	134
I alt	12	135	147

Clone 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
	n/N	% (95 % CI)	
Samlet procentvis overensstemmelse	144/147	98.0 % (94.2-99.3)	
Positiv procentoverensstemmelse	11/12	91.7% (64.6-98.5)	
Negativ procentoverensstemmelse	133/135	98.5% (94.8-99.6)	

Tab. 36. 2x2-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme for BenchMark GX-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit: gastrisk karcinom.

Clone 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
Positive	11	1	12
Negativ	3	140	143
I alt	14	141	155
	n/N	% (95 % CI)	
Samlet procentvis overensstemmelse	151/155	97.4% (93.6-99.0)	
Positiv procentoverensstemmelse	11/14	78.6% (52.4-92.4)	
Negativ procentoverensstemmelse	140/141	99.3% (96.1-99.9)	

Tab. 37. 2x2-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme for BenchMark-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit: gastrisk karcinom.

Clone 4B5 med <i>iVIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
Positive	12	3	15
Negativ	3	156	159
I alt	15	159	174
	n/N	% (95 % CI)	
Samlet procentvis overensstemmelse	168/174	96.6% (92.7-98.4)	
Positiv procentoverensstemmelse	12/15	80.0% (54.8-93.0)	
Negativ procentoverensstemmelse	156/159	98.1% (94.6-99.4)	

Tab. 38. 2x2-analyse af overensstemmelsesrater mellem platforme for BenchMark GX-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit: gastrisk karcinom.

Clone 4B5 med <i>iVIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
Positive	11	3	14
Negativ	4	154	158
I alt	15	157	172

Clone 4B5 med iVIEW DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positive	Negative	I alt
	n/N	% (95 % CI)	
Samlet procentvis overensstemmelse	165/172	95.9% (91.8-98.0)	
Positiv procentoverensstemmelse	11/15	73.3% (48.0-89.1)	
Negativ procentoverensstemmelse	154/157	98.1% (94.5-99.3)	

KLINISK PRÆSTATION

HER2-lav brystkræft

Undersøgelse af klinisk udfald – DESTINY-BREAST04

DESTINY-BREAST04 var et randomiseret, åbent, aktivt kontrolleret multicenterforsøg i fase III, som evaluerede sikkerheden og effektiviteten af trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) i ikke-resektabel og/eller metastatiske forsøgspersoner med brystkræft, der udtrykker lave niveauer af HER2.

For at være egnede til inklusion i undersøgelsen skulle tumorerne udvise lave niveauer af HER2-ekspression bestemt vha. IHC med anti-HER2 (4B5)-antistoffet.

En tumor med en HER2 IHC-score på 1+ blev betragtet som at indikere en HER2-lav status. En tumor blev også betragtet som HER2-lav, hvis HER2 IHC-scoren var 2+ og reflekstesten med INFORM HER2 Dual ISH-analysen indikerede fraværet af HER2-genamplifikation (ISH-). De indskrevne patienter blev randomiseret i et 2:1-forhold til behandling med trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) eller til kemoterapibehandling efter lægens valg. Den centralt indhentede HER2-lav score (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH-) var en af tre stratifikationsfaktorer anvendt til patientrandomisering i den undersøgelse.

Der blev udført effektivitetsanalyser i det komplette analysesæt og positiv population for hormonreceptor (positiv for østrogenreceptor og/eller progesteronreceptor).

I den primære analyse blev progressionsfri overlevelse (PFS) baseret på en vurdering efter blindet uafhængig central gennemgang (BICR) analyseret i det positive undersæt for hormonreceptor med stratifikation efter centralt vurderet HER2-lav status/score (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH-), antal tidligere linjer af kemoterapi (1 eller 2) og tidligere cyclinafhængig behandling med (CDK)4/6-hæmmere (ja eller nej). Behandling med trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) var forbundet med en statistisk signifikant og klinisk meningsfuld stigning i PFS såvel som den samlede overlevelse (OS) i denne population sammenlignet med lægens valgte behandling.

Tab. 39. PFS og OS ifølge BIRC i den hormonreceptor-positive population og komplet analysesæt (DESTINY-BREAST04)

Parameter	Positiv population for hormonreceptor		Komplet analysesæt	
	Trastuzuma b deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Lægens standardbehandling g N = 163	Trastuzuma b deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Lægens standardbehandling g N = 184
Median PFS a (95% CI)	10.1 (9.5, 11.5)	5.4 (4.4, 7.1)	9.9 (9.0, 11.3)	5.1 (4.2, 6.8)
Fareforhold d b (95 % CI)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	
P-værdi c	<0.0001		<0.0001	
Samlet overlevelse (OS)				
Median OS a (95 % CI)	23.9 (20.8, 24.8)	17.5 (15.2, 22.4)	23.4 (20.0, 24.8)	16.8 (14.5, 20.0)

Parameter	Positiv population for hormonreceptor		Komplet analysesæt	
	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Lægens standardbehandling N = 163	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Lægens standardbehandling N = 184
Fareforhold b (95 % CI)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
P-værdi c	0.0028		0.0010	

CI = konfidensinterval, FPS = progressionsfri overlevelse, OS = samlet overlevelse

a Median PFS og OS er estimeret fra Kaplan-Meier analyse. Tosidede 95 CI'er for median FPS og OS blev beregnet ved hjælp af Brookmeyer-Crowley metoden.

b Baseret på stratificeret Cox-proportional faremodel. Stratifikationsfaktorer var HER2-lav score, antal tidligere linjer af kemoterapi og enten tidligere cyclinafhængig behandling med kinaseinhibitor 4/6 (for komplet analysesæt og positiv hormonreceptor) eller hormonreceptor/cyclinafhængig kinasestatus (for komplet analysesæt).

c Tosidet P-værdi fra stratificeret log-rank-test.

HER2-positiv brystkræft

Sammenligningsundersøgelser af klon 4B5-monoklonalt kanin-antistof og PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody ved brystkræft

Der blev foretaget en metodesammenligningsundersøgelse af sammenhængen mellem klon 4B5 og PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof) og PathVysion HER2 FISH, der begge er tidligere godkendte diagnosticeringstests. Seks investigatører deltog i undersøgelsen. To uafhængige kohorter af invasive brystkræftprøver blev anvendt i undersøgelsen: en med 178 prøver fra Cleveland Clinic Foundation (kohorte 1) og en med 144 prøver indsamlet af IMPATH Predictive Oncology fra flere internationale laboratorier (kohorte 2). To sæt af tre forskellige investigatører evaluerede de to uafhængige kohorter (kohorte 1: n = 178, kohorte 2: n = 144) med kendte tilfælde af brystkræft farvet med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof og klon 4B5. FISH-data blev indhentet fra patienterne anamnese. Der blev oprettet en konsensuscore fra de tre læsere for hvert antistof for hvert tilfælde for at reducere variabilitet mellem læserne, som den kendes ved HER2-scoring.^{42,43,44} I alt 322 tilfælde blev evalueret. Objektglassene, der var farvet med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof, blev behandlet og farvet i henhold til producentens instruktioner som anført i metodearket til PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof. I gennemsnit gik der cirka et år mellem farvning og læsning af farvede objektglas med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof. Klinisk betydningsfulde resultater (positive/negative) fra HER2 (4B5) IHC-analysen og PATHWAY anti-HER2 (CB11) IHC-analysen i de to kohorter vises nedenfor:

Tab. 40. Klinisk signifikante scorer: IHC-analyser for kohorte 1

HER2 (4B5)-antistof	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof		
	Positive	Negative	I alt
Positive	86	5	91
Negativ	7	80	87
I alt	93	85	178
	n/N	% (95 % konfidensinterval)	
Positiv procentoverensstemmelse	86/93	92.5 (85.2-96.9)	
Negativ procentoverensstemmelse	80/85	94.1 (86.8-98.1)	
Samlet procentvis overensstemmelse	166/178	93.3 (88.5-96.4)	
Klinisk betydningsfulde resultater blev betragtet IHC-positive (2+ og 3+) og negative (0+ og 1+).			

Tab. 41. Klinisk signifikante scorer: IHC-analyser for kohorte 2

HER2 (4B5)-antistof	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistof		
	Positive	Negative	I alt
Positive	69	22	91
Negativ	0	53	53
I alt	69	75	144
	n/N	% (95 % konfidensinterval)	
Positiv procentoverensstemmelse	69/69	100 (97.5-100)	
Negativ procentoverensstemmelse	53/75	70.6 (58.5-80.1)	
Samlet procentvis overensstemmelse	122/144	84.7 (78.2-90.0)	
Klinisk betydningsfulde resultater blev betragtet IHC-positive (2+ og 3+) og negative (0+ og 1+).			

De IHC-baserede resultater fra HER2 (4B5) IHC-analysen blev også sammenlignet med resultaterne fra PathVysion HER2 FISH-analysen. IHC-positiv resultater svarer til tilfælde med en IHC-score på 2+ eller 3+ og FISH-positiv resultater svarer til tilfælde, det påviste amplifikation af HER2-genet. Overensstemmelsesdata for klon 4B5 IHC-analysen sammenlignet med FISH-resultater i de to kohorter vises nedenfor:

Tab. 42. Klinisk signifikant overensstemmelse: IHC og FISH for kohorte 1

HER2 (4B5)-antistof	n/N	% (95 % konfidensinterval)
Positiv procentoverensstemmelse	83/93	89.2 (82.5-95.1)
Negativ procentoverensstemmelse	77/85	90.6 (84.0-96.4)
Samlet procentvis overensstemmelse	160/178	90.0 (85.4-93.6)

Tab. 43. Klinisk signifikant overensstemmelse: IHC og FISH for kohorte 2

HER2 (4B5)-antistof	n/N	% (95 % konfidensinterval)
Positiv procentoverensstemmelse	80/86	93.0 (87.9-96.3)
Negativ procentoverensstemmelse	47/58	81.0 (73.4-86.0)
Samlet procentvis overensstemmelse	127/144	88.2 (82.1-92.2)

Konklusion: Denne undersøgelse påviste, at der er signifikant konkordans (samlet overensstemmelse mellem positive/negative resultater) mellem klon 4B5-analysen og PATHWAY anti-HER2 (CB11)-analysen, hvilket påviser, at VENTANA HER2 (4B5)-analysen er et acceptabelt alternativ til PATHWAY anti-HER2 (CB11)-analysen til brug som hjælp til at vurdere brystkræftpatienter, for hvem behandling med trastuzumab (Herceptin) overvejes. Denne undersøgelse viste også, at HER2-ekspressionsresultater, der er opnået med klon 4B5 IHC-analysen, er sammenlignelige med resultater af HER2-genstatus bestemt ved FISH-analyse.

Sammenligning til inkludering for undersøgelserne PERJETA (pertuzumab) og KADCYLA (trastuzumab emtansin) vedrørende brystkarcinom

Der blev konstateret overensstemmelse mellem kohorterne fra PERJETA- og KADCYLA-undersøgelserne ved brug af farvning af forsøgspåre med VENTANA HER2 (4B5)-analyse. I alt 2753 prøver, der blev evalueret i forbindelse med PERJETA-forsøget, og 99 prøver, der blev evalueret i forbindelse med KADCYLA-forsøget, blev farvet med VENTANA HER2 (4B5)-analyse. Overensstemmelsesraterne (PPA, NPA og OPA) blev bestemt. 95 % CI (tosidet 95 %-konfidensinterval) blev beregnet ved brug af scoringsmetoden.

Tab. 44. Overensstemmelse mellem klon 4B5- og Dako-analyserne for HER2-statusen for alle HER2-evaluerbare forsøgspersoner. IHC-evaluerbare forsøgspersoner har enten en positiv eller en negativ HER2-status, hvilket bestemmes af både klon 4B5- og inkluderings-IHC-analysen.

Undersøgelse	Klon 4B5-score ^b	Dako HER2-status ^{a,b}		
		Positive	Negative	I alt
PERJETA og KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	I alt	2558	272	2830
	Positiv procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2380/2558 (93.0) (92.0-94.0)		
	Negativ procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	257/272 (94.5) (91.1-96.6)		
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2637/2830 (93.2) (92.2-94.1)		

^a Positiv = IHC-positiv og/eller ISH-amplificeret. Negativ = IHC-negativ og ikke ISH-amplificeret eller ikke ISH-amplificeret og ikke IHC-positiv.

^b IHC: Positiv = 3+; negativ = 0, 1+ eller 2+.

Tab. 45. Overensstemmelse mellem klon 4B5- og Dako-analyserne vedrørende IHC-status for alle IHC-evaluerbare forsøgspersoner. IHC-evaluerbare forsøgspersoner har enten en positiv eller en negativ HER2-status, hvilket bestemmes af både klon 4B5- og inkluderings-IHC-analysen.

Undersøgelse	Klon 4B5-status ^a	Dako HercepTest-status ^a		
		Positive	Negative	I alt
PERJETA og KADCYLA	Positive	2330	65	2395
	Negativ	21	414	435
	I alt	2351	479	2830
	Positiv procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2330/2351 (99.1) (98.6-99.4)		
	Negativ procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	414/479 (86.4) (83.1-89.2)		
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2744/2830 (97.0) (96.3-97.5)		
PERJETA	Positive	2267	63	2330
	Negativ	10	399	409
	I alt	2277	462	2739
	Positiv procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2267/2277 (99.6) (99.2-99.8)		

		Dako HercepTest-status ^a		
Undersøgelse	Klon 4B5-status ^a	Positive	Negative	I alt
KADCYLA	Negativ procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	399/462 (86.4) (82.9-89.2)		
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2666/2739 (97.3) (96.7-97.9)		
	Positive	63	2	65
	Negativ	11	15	26
	I alt	74	17	91
	Positiv procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	63/74 (85.1) (75.3-91.5)		
KADCYLA	Negativ procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	15/17 (88.2) (65.7-96.7)		
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	78/91 (85.7) (77.1-91.5)		
	Positive	63	2	65
	Negativ	11	15	26
	I alt	74	17	91
	Positiv procentoverensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	63/74 (85.1) (75.3-91.5)		

^a Positiv = 3+; negativ = 0, 1+ eller 2+.

Tab. 46. Overensstemmelse mellem klon 4B5- og Dako-analyserne vedrørende IHC-score for alle IHC-evaluerbare forsøgspersoner. IHC-evaluerbare forsøgspersoner har enten en positiv eller en negativ HER2-status, hvilket bestemmes af både klon 4B5- og inkluderings-IHC-analysen.

		Dako HercepTest-score			
Undersøgelse	Klon 4B5-score	3+	2+	0/1+	I alt
PERJETA og KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	I alt	2351	325	154	2830
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2703/2830 (95.5) (94.7-96.2)			
PERJETA	3+	2267	62	1	2330
	2+	9	226	13	248
	0/1+	1	24	136	161
	I alt	2277	312	150	2739
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	2629/2739 (96.0) (95.2-96.7)			

		Dako HercepTest-score			
Undersøgelse	Klon 4B5-score	3+	2+	0/1+	I alt
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	I alt	74	13	4	91
	Samlet procentvis overensstemmelse n/N (%) (95 % CI)	74/91 (81.3) (72.1-88.0)			

Tab. 47. Klon 4B5-farvningsacceptabilitet. IHC-testede forsøgspersoner. IHC-farvning anses som værende acceptabel, hvis der kunne bestemmes en gyldig IHC-score (0, 1+, 2+ eller 3+). Årsager til uacceptabel farvning inkluderer uacceptabel negativ kontrol, vævstab, utilstrækkelig tumor, uacceptabel baggrund og uacceptabel morfologi.

Parameter	PERJETA	KADCYLA	PERJETA og KADCYLA
Antal indledende IHC-tests	2753	99	2852
Indledende farvningsacceptabilitet n/N (%) (95 % CI)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Antal gentagne IHC-tests	40	0	40
Endelig farvningsacceptabilitet n/N (%) (95 % CI)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

Undersøgelse af klinisk udfald – KATHERINE

Funktionen af HER2klon 4B5 og INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (INFORM HER2 Dual ISH-analyse) blev undersøgt i KATHERINE (BO27938), et randomiseret, åbent multicenterforsøg i fase III med det formål at evaluere effektiviteten og sikkerheden af trastuzumab emtansin (KADCYLA) versus trastuzumab (Herceptin) som adjuverende behandling til patienter med HER2-positiv primær brystkræft og residual tumor patologisk i et bryst eller i aksillaryknuderne efter præoperativ behandling (NCT01772472).

Patientprøverne blev farvet med klon 4B5 og/eller INFORM HER2 Dual ISH og evalueret for farvningsacceptabilitet og HER2-status. Samlet set var størstedelen af prøverne præoperative biopsier (80.9 %), indsamlet primært som biopsier (75.3 %) eller via kirurgiske indgreb (24.3 %). Flere præparater udviste en duktal neoplastisk understype (95.4 %), og størstedelen blev ikke indsamlet fra en metastatisk prøve (96.2 %).

I KATHERINE deltog 1486 patienter med HER2-positiv tidlig brystkræft og residual invasiv tumor i et bryst og/eller aksillaryknuderne efter taxan- og trastuzumabbaseret behandling som del af et neoadjuverende regime før deltagelse i undersøgelsen. Patienterne modtog strålebehandling og/eller hormonbehandling samtidig med undersøgelsesbehandling i henhold til lokale retningslinjer. Prøver af brystkræfttumorer var nødvendige for at påvise HER2-overekspression defineret som 3+ IHC eller ISH-amplifikationsforhold ≥ 2.0 bestemt på et centralt laboratorium. Patienterne blev randomiseret (1:1) med henblik på behandling med trastuzumab eller KADCYLA. Randomiseringen blev stratificeret efter klinisk stadium ved præsentation, hormonreceptorstatus, præoperativ HER2-orienteret behandling (trastuzumab, trastuzumab plus ekstra HER2-orienterede middel/midler), og den patologiske knudestatus blev evalueret efter den præoperative behandling.

Det primære effektivitetsslutpunkt for KATHERINE-undersøgelsen var sygdomsfri overlevelse af invasiv sygdom (IDFS). IDFS blev defineret som tiden fra randomiseringsdatoen til første tilfælde af tilbagevendende ipsilateral invasiv brysttumor,

tilbagevendende ipsilateral lokal eller regional invasiv brystkræft, fjern tilbagevendelse, kontralateral invasiv brystkræft eller dødsfald uanset årsag.

Der blev observeret en klinisk meningsfuld og statistisk væsentlig forbedring i IDFS hos patienter, hvis brystkræftprøver blev identificeret som HER2-positiv med klon 4B5 IHC-analysen, der modtog trastuzumab emtansin (KADCYLA) sammenlignet med trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, 95 % CI (0.32, 0.58)), svarende til en 57 % lavere risiko for en IDFS-hændelse. Effektivitetsresultaterne for den IHC-positiv undergruppe er præsenteret i Tab. 48.

Dataanalysen viser desuden, at midlets effektivitet uanset justering for differentiell prøvetagning i undersøgelsespopulationen på grund af lokal testscreening er tilsvarende.

Tab. 48. Effektivitetsresultaterne fra KATHERINE for den IHC-positiv undergruppe.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
Primært slutpunkt	Fri overlevelse af invasiv sygdom (IDFS) ^a	
Antal (%) patienter med hændelse	64 (11.2%)	130 (23.3%)
HR [95 % CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
Frekvens af 3-år uden hændelser % ^b	89.0	75.7

^a Data fra første mellemanalyse

^b Frekvens af 3 år uden hændelser stammer fra Kaplan-Meier-estimer

Data fra KATHERINE-undersøgelsen viser, at adjuverende trastuzumab emtansin (KADCYLA) udviste en tydelig behandlingsfordel sammenlignet med adjuverende trastuzumab (Herceptin) hos patienter med HER2-positiv tidlig brystkræft og residual sygdom efter færdiggørelse af neoadjuverende behandling. HER2-klon- 4B5 og INFORM HER2 Dual ISH-analyserne er nyttige til at identificere de patienter, som sandsynligvis vil have gavn af behandling med trastuzumab emtansin (KADCYLA).

Gastrisk cancer

Sammenligning af klon 4B5 og HercepTest i human gastrisk cancer

Der blev foretaget en blindet ekstern undersøgelse for at sammenligne farvnings effektiviteten af klon 4B5 på BenchMark XT-instrumentet med farvnings effektiviteten af Dako HercepTest. Der blev undersøgt to kohorter af prøver, (1) nykonstruerede vævsmikroarrays (TMA'er) omfattende 248 tilfælde af gastrisk cancer (seks tilfælde viste sig senere at være dubletter og blev fjernet), og (2) en undergruppe af 183 prøver fra kliniske forsøg fra ToGA-forsøget (Trastuzumab for Gastric Cancer), hvor man undersøgte HER2-status og klinisk behandlingsresultat hos patienter, der fik behandling med Herceptin (trastuzumab). Laboratoriet farvede vævssnittene med klon 4B5 og HercepTest. I alt 431 tilfælde blev farvet ved begge analyser, og (efter fjernelse af dubletter) 398 unikke tilfælde blev inkluderet i sammenligningen. En patolog bedømte vævssnittene på en skala mellem 0/1+, 2+ og 3+. Scorene 2+ og 3+ blev anset som værende positive, og scorene 0 og 1+ blev anset som værende negative. Overensstemmelsesrater mellem klon 4B5 og HercepTest, for begge undersøgte kohorter vises i nedenstående tabel.

Tab. 49. Overensstemmelsesdata for klon 4B5 (IHC) sammenlignet med HercepTest i gastrisk karcinom.

Vævskilde	Samlet procentvis overensstemmelse (95 % CI)	Positiv procentoverensstemmelse (95 % CI)	Negativ procentoverensstemmelse (95 % CI)
TMA ^a & ToGA ^b	91.0 (87.7-93.4)	82.1 (70.2-90.0)	92.4 (89.1-94.8)
n	362 / 398	46 / 56	316 / 342

IHC-resultater 2+ og 3+ blev anset som værende antistofpositive, og IHC-resultater 0+ og 1+ blev anset som værende antistofnegative.

^a TMA: vævsmikroarrayprøver

^b ToGA: prøver fra kliniske forsøg fra ToGA-forsøget

FEJLFINDING

1. Hvis den positive kontrol udviser svagere farvning end forventet, skal de andre positive kontroller, der blev kørt under samme instrumentkørsel, kontrolleres for at afgøre, om det skyldes det primære antistof eller et af de fælles sekundære reagenser.
2. Hvis den positive kontrol er negativ, skal det kontrolleres, om objektglasset har den rigtige strekcodeetiket. Hvis objektglasset er mærket korrekt, skal du kontrollere de andre positive kontroller, der blev kørt på det samme instrument, for at afgøre, om det skyldes det primære antistof eller et af de fælles sekundære reagenser. Vævene kan være forkert indsamlet, fikseret eller afparaffineret. Den korrekte procedure for indsamling, opbevaring og fiksering skal følges.
3. Hvis al paraffin ikke er fjernet, vil der muligvis ikke være nogen farvning. Afparaffineringsprocessen skal gentages.
4. Hvis vævssnit vaskes af objektglasset, skal objektglassene kontrolleres for at sikre, at de er positivt ladede.
5. Hvis kernefarvning og cytoplasmisk farvning er til stede i normale slimhinder tæt på tumorområdet i det gastriske karcinom og forstyrrer fortolkningen af resultatet af membranfarvningen, kan det pågældende vævssnit testes via ISH.
6. Se afsnittet Farvningsprocedure i instrumentets brugervejledning for at få flere oplysninger om afhjælpning, eller kontakt din lokale supportrepræsentant.

REFERENCER

1. Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
3. Schroll AS, Pedersen HC, Jensen SS, Nielsen SL, Brünner N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) immunoreactivity: specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. Histopathology. 2011;59(5):975-983.
4. Jay JL, Brunhoeber PS, Smith MH, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). Histopathology. 2013;62(4):563-577.
5. Moasser MM. The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
6. Hsu JL, Hung MC. The Role of HER2, EGFR, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016;35(4):575-588.
7. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
8. Tarantino P, Hamilton E, Tolane SM, et al. HER2-low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. J Clin Oncol. 2020;38:1951-1962.
9. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, et al. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. Clin Cancer Res 11:865S-870S, 2005.
10. Eiger D, Agostinetto E, Saude-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-low Breast Cancer Treatment. Cancers (Basel). 2021;13.
11. Zhang H, Katerji H, Turner BM, Hicks DG. HER2-low Breast Cancers. Am J Clin Pathol. 2021.
12. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376: 687-697.
13. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. Gastrointest Endosc. 2019;90(1):44-54.
14. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Ann Oncol. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
15. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. Gastric Cancer. 2015;18(3):476-484.
16. The Global Cancer Observatory: Cancer Today (GLOBOCAN) 2020. International
17. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College

of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. Arch Pathol Lab Med. 2018;142:1364-1382.

18. Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
19. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.
20. Hudis CA. Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.
21. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001;344(11):783-792.
22. Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
23. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2019;380(7):617-628.
24. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.
25. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(8):1154-1161.
26. Modi S, Park H, Murthy RK, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. J Clin Oncol. 2020;38:1887-1896.
27. Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer [published online ahead of print, 2022 Jun 5]. N Engl J Med. 2022;10.1056/NEJMoa2203690.
28. Cislo M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, et al. Distinct Molecular Subtypes of Gastric Cancer: From Lauren to Molecular Pathology. Oncotarget. 2018;9(27):19427-19442.
29. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
30. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
31. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
32. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of 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.
33. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
34. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
35. 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.
36. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008;52:797-805.
37. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
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. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
41. Ahn S, Woo JW, Lee K, et al. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. J Pathol Trans Med. 2020;54:34-44.
42. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization, Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
43. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
44. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomicic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

BEMÆRK: Der anvendes altid et punktum i dette dokument som decimaltegn til markering af grænsen mellem det hele tal og de efterfølgende decimaler. Der anvendes ikke tusindtalsseparatorer.

Sammenfatningen af sikkerhed og ydeevne kan findes her: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboler

Ventana bruger følgende symboler og tegn ud over dem, der er anført i ISO 15223-1-standard (for USA: Se elabdoc.roche.com/symbols for yderligere oplysninger).

GTIN Globalt vareidentifikationsnummer

Rx only For USA: Forsigtig! Ifølge amerikansk føderal lovgivning må dette udstyr kun sælges af eller efter ordination fra en læge.

REVISIONSHISTORIK

Rev	Opdateringer
C	Opdateringer til afsnittet om farvningsprocedure og scoringskonventioner for gastrisk karcinom i tabel 7. Tilretninger af terminologi og tegnsætning. BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet er blevet tilføjet.

OPHAVSRET

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY og ULTRAVIEW er varemærker tilhørende Roche. Alle andre produktnavne og varemærker tilhører deres respektive ejere.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTOPLYSNINGER

 Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606
www.roche.com

 0123