

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

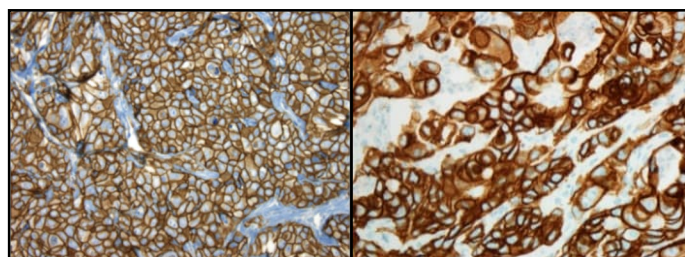


Fig. 1. VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx färgning i bröstkarinom.

Fig. 2. VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx 3+-färgning i magkarinom.

AVSEDD ANVÄNDNING

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx är avsedd för semikvantitativ detektion av HER2-antigen genom immunhistokemi (IHC) i snitt av formalinfixerad, paraffinbäddad bröstvävnad och magvävnad som färgats på ett BenchMark IHC/ISH-instrument.

Denna IHC-enhet är avsedd för behandlingsvägledande diagnostik för att identifiera bröstcancerpatienter som kvalificerar för behandling med trastuzumab (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH amplifierad), pertuzumab (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH amplifierad), trastuzumab emtansin (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH amplifierad) eller trastuzumab deruxetecan (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH icke-amplifierad). Dessutom indikeras denna IHC-enhet för behandlingsvägledande diagnostik för att identifiera magcancerpatienter som där behandling med trastuzumab övervägs (IHC 3+ eller IHC 2+/ISH amplifierad).

Denna produkt bör tolkas av en kvalificerad patolog tillsammans med en histologisk undersökning, relevant klinisk information och lämpliga kontroller.

Denna antikropp är avsedd för användning vid *in vitro*-diagnostik (IVD).

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (VENTANA HER2 (4B5) Assay) innehåller en kanin monoklonal antikropp (klon 4B5) som är riktad mot den inre domänen hos human epidermal tillväxtfaktorreceptor 2 (HER2). HER2 klonades och karakteriserades.¹ Klon 4B5 har visat sig reagera med ett 185 kDa-protein från SK-BR-3-cellsat via Western blotting. SK-BR-3 är en bröstkarinom-cellinje som har ett 128-faldigt överuttryck av HER2 mRNA.² Storleken på det identifierade bandet korrelerar väl med det som rapporterats för HER2-proteinet (185 kDa).¹ Immunhistokemiska (IHC) experiment med transfekterade cellinjer (HEK293) har visat att klon 4B5 färgar celler som transfekterats med HER2 samt celler som transfekterats med HER4 även om ingen färgning av celler transfekterade med HER1 eller HER3 observerades och Western blot-data med rekombinant HER4-protein indikerar även att klon 4B5 känner igen en HER4-epitop.³ Trots detta har HER2 (4B5) inte observerats korsreagera med HER4 vid IHC-färgning av formalinfixerad, paraffinbäddad (FFPE) bröstvävnad.⁴

HER2 är en transmembran tyrosinkinasreceptor som strukturellt liknar epidermal tillväxtfaktorreceptor.^{5,6} Genamplifiering och motsvarande överuttryck av HER2 har funnits i en mängd olika tumörer, inklusive bröstkarinom.^{5,6,7} Proteinöveruttryck på grund av amplifiering av HER2-genen är den primära drivkraften för HER2-medierad tumörigenes.⁵ Genamplifiering resulterar vanligtvis i en markant ökning av HER2-receptorer vid cellmembranet.^{5,6} Överuttryck av HER2 förbättrar signaltransduktionen och uppreglerar proliferering och differentiering vilket slutligen orsakar tumörbildning.^{5,6}

Ett spektrum av HER2-proteinuttryck har observerats i frånvär av genamplifiering.⁸ Olika faktorer har föreslagits förklara mellanliggande nivåer av HER2-proteinöveruttryck i bröstcancerfall i frånvär av genamplifiering inklusive crosstalk mellan HER2- och

östrogenreceptorsignaleringsvägar.^{8,9} HER2-proteinuttryck som inte anses överuttryck kan klassificeras som HER2-lågt uttryck.^{8,10,11}

HER2-proteinöveruttryck och/eller genamplifiering inträffar vid adenokarcinom i mage eller esofagogastriska förbindelsen.^{12,13,14} En rad olika HER2-överuttryckfrekvenser har rapporterats i publicerade studier. En av de största screeningdatauppsättningarna som innefattade 3803 patienter med adenokarcinom i mage eller esofagogastriska förbindelsen rapporterade dock att 22 procent av patienterna testade positivt för HER2-proteinöveruttryck eller genamplifiering.¹⁵

KLINISK SIGNIFIKANS

Bröstcancer är den vanligast diagnostiserade cancersorten för kvinnor över hela världen.¹⁶ Tidig identifiering och rätt val av behandling kan ha en markant inverkan på total överlevnad.^{7,17} Ungefär 15 till 30 procent av invasiva duktala typer av bröstcancer är positiva för HER2.^{7,10} Nästan alla fall av Pagets sjukdom i bröst och upp till 90 procent av fall av duktalt karinom in situ av comedo-typ är positiva.^{18,19} HER2-positiv status har definierat en undergrupp av bröstcancerpatienter som har fördel av HER2-riktad behandling i mer än 20 år.^{7,17} Den HER2-positiva populationen har historiskt definierats som patienter som uppvisar överuttryck av HER2-protein enligt bedömning med immunhistokemi (IHC) baserat på ett semikvantitativt IHC-poängssystem (0, 1+, 2+ och 3+) och/eller genamplifiering bedömd med in situ-hybridisering (ISH).¹⁷ HER2-positivitet har en stark korrelation med proteinöveruttryck (IHC-poäng på 3+). I fall med gränfallsöveruttryck (IHC-poäng 2+, tvektigt) ett bekräftande reflextest för att bedöma genamplifiering kan krävas enligt fastställd HER2 tolkningsalgoritm.¹⁷

Läkemedel för behandling som finns på marknaden, inklusive Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) och KADCYLA (ado-trastuzumab emtansin/trastuzumab emtansin) har visat sig gynna HER2-positiva bröstcancerpatienter genom att bromsa och i vissa fall tillbakabilda cancertillväxten.^{20–24} Trastuzumab och pertuzumab är humaniserade monoklonala antikroppar som binder till HER2-proteinet på cellytan och stör ut HER2-medierad signaltransduktion.^{20,24,25} Trastuzumab emtansin är ett antikropp-läkemedel-konjugat som består av trastuzumab och den cytotoxiska agenten DM1 konjugerat med en icke-klyvbar linker.²³ Endast patienter med HER2-positiv bröstcancer (IHC-poäng på 3+ eller 2+ med bekräftad HER2-amplifierad status) gynnas av behandling med trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA) eller trastuzumab emtansin (KADCYLA).^{16,18}

Ungefär 40–50 procent av bröstcancerpatienter har tumörer som inte uppvisar amplifiering av HER2-genen och inte överuttrycker receptorn, men låga nivåer av HER2-uttryck detekteras.^{8,10} HER2-lågt uttryckta fall (IHC-poäng på 1+ eller 2+ (med en bekräftad HER2 icke-amplifierad status)) anses vanligtvis vara HER2-negativa och undantas från HER2-riktade behandlingsalternativ.⁸ Nyligen har fördelar observerats med anti-HER2-behandlingen trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®) hos bröstcancerpatienter med låga nivåer av HER2-uttryck.^{26,27} Trastuzumab deruxetecan är ett antikropp-läkemedelskonjugat som innehåller en HER2-riktad monoklonal antikropp som bas (trastuzumab), en klyvbar linker och ett cellmembranpermeabelt exatekanderivat (en nyttolast med topoisomeras I-hämmare).¹⁰

In vitro-diagnostik för bedömning av HER2-status hos bröstcancerpatienter är viktigt för att hjälpa läkaren vid bedömning av behandling med trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansin (KADCYLA) eller trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®).¹⁷ Den IHC-baserade detektionen av HER2-proteinuttryck används som hjälp vid bedömning av bröstcancerpatienter för vilka HER2-riktade behandlingar trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansin (KADCYLA) eller trastuzumab deruxetecan (ENHERTU®) övervägs.

Magcancer är den femte vanligaste cancerformen och en ledande orsak för cancerrelaterade dödsfall globalt.¹³ Kirurgi är den vanligaste behandlingsformen för magcancer.^{14,28} De flesta magcancerfall detekteras dock i ett sent skede och kirurgin är ofta svår att genomföra.^{14,28} Kemoterapi används för att behandla långt framskridna fall av magcancer även om överlevnaden för dessa patienter är väldigt låg.^{14,28} Den HER2-riktade behandlingen trastuzumab är en stöttepelare vid hantering av invasiv bröstcancer och har behandlingsvärde vid hantering av magcancerpatienter med överuttryck av receptorn.^{12,14} Demonstrering av HER2-genamplifiering och/eller proteinöveruttryck är avgörande för att välja ut patienter för behandling med trastuzumab.^{12,14} Kliniska studier har visat att bröst- eller magcancerpatienter med högt HER2-proteinöveruttryck och/eller genamplifiering har mest fördel från trastuzumab.^{12,21} IHC-baserad detektion av HER2-proteinuttryck används som hjälp vid bedömning av magcancerpatienter för vilka behandling med trastuzumab (Herceptin) övervägs.

PRINCIPER FÖR PROCEDUREN

VENTANA HER2 (4B5)-analysen innehåller en kanin monoklonal antikropp som binder till HER2 i FFPE-vävnadsnitt. Den specifika antikroppen kan lokaliserar med hjälp av ett sekundärantikropp-HRP-konjugat (*ultraView Universal DAB Detection Kit*). Det specifika antikropp-enzym-komplexet visualiserar sedan med en utfällningsenzymreaktionsprodukt. Varje steg inkuberas under en exakt tid och temperatur. I slutet av varje inkubationssteg tvättar instrumentet snitten för att stoppa reaktionen och ta bort obundet material som skulle hindra den önskade reaktionen i efterföljande steg. Instrumentet applicerar också Liquid Coverslip, vilket minimerar avdunstningen av de vattenhaltiga reagensen från objektglaset.

Kliniska fall bör utvärderas inom ramen för hur lämpliga kontroller presterar. Inkludering av en positiv vävnadskontroll, fixerad och bearbetad på samma sätt som patientprovet rekommenderas (till exempel ett svagt positivt bröstcancerfall). Förutom att färga med VENTANA HER2 (4B5) Assay, ska ett andra objektglas färgas med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. För att testet ska anses giltigt bör den positiva kontrollvävnaden uppvisa membranfärgning av tumörceller. Dessa komponenter bör vara negativa när de färgas med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Dessutom rekommenderas att ett negativt vävnadskontrollobjektglas (till exempel ett HER2-negativt bröstcancerfall eller gastriskt cancerfall) inkluderas för varje uppsättning prover som bearbetas och körs på ett BenchMark IHC/ISH-instrument. Denna negativa vävnadskontroll ska färgas med VENTANA HER2 (4B5) Rx/Dx för att säkerställa att antigenförstärkningen och andra förbehandlingsprocedurer inte skapar falsk positiv färgning.

MEDFÖLJANDE MATERIAL

VENTANA HER2 (4B5) Assay innehåller tillräckligt med reagens för 50 tester.

En 5 mL dispenser med VENTANA HER2 (4B5) Assay innehåller ca 30 µg kanin monoklonal antikropp riktad mot humant HER2-antigen.

Antikroppen späds i 0.05 M Tris-buffrad saltlösning, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 med 0.3 % bärprotein och 0.05 % natriumazid, ett konserveringsmedel. Det finns spår av fetalt kalvserum, ungefär 0.25 % närvarande från stamlösningen.

Specifik antikropps-koncentration är ca 6 µg/mL.

VENTANA HER2 (4B5) Assay är en kanin-IgG utspädd från vävnadsodlingssupernatanter.

Se lämpligt metodblad för VENTANA-detektionskit för en detaljerad beskrivning av:

Principer för proceduren, Material och metoder, Provsamling och beredning för analys, Procedurer för kvalitetskontroll, Felsökning, Tolkning av resultaten och Begränsningar.

NÖDVÄNDIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER

Färgningsreagens som VENTANA -detektionskit och tillhörande komponenter, inklusive objektglas med negativa och positiva vävnadskontroller, medföljer inte.

Eventuellt är inte alla produkter i metodbladet tillgängliga i alla länder. Rådfråga din lokala supportrepresentant.

Följande reagenser och material kan behövas vid färgning men medföljer ej:

1. Rekommenderad kontrollvävnad
2. Objektglas för mikroskop, positivt laddade
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. nr 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView Universal 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. Laboratorieutrustning för allmänt bruk
14. BenchMark IHC/ISH-instrument

FÖRVARING OCH STABILITET

Förvaras vid 2–8 °C vid mottagandet och när den inte används. Får ej frysas.

För att garantera korrekt reagenstillförsel och antikroppens stabilitet måste locket på dispensern sättas på igen efter varje användning, och dispensern omedelbart placeras i kylskåp i upprätt läge.

Varje antikroppsdispenser är märkt med utgångsdatum. Vid korrekt förvaring är reagenset stabilt fram till det datum som anges på etiketten. Använd inte reagenset efter detta utgångsdatum.

PROVBEREDNING

Rutinmässigt bearbetade FFPE -vävnader är lämpliga för användning med denna primärantikropp när de används med VENTANA-detektionskit och BenchMark IHC/ISH-instrument. Rekommenderat vävnadsfixeringsmedel är 10 % neutralbuffrad formalin.²⁹ Objektglaset bör färgas omedelbart, eftersom antigenicitet i vävnadsnitt kan avta med tiden.

Det rekommenderas att positiva och negativa kontroller körs samtidigt som okända prover.

Cirka 4 µm tjocka snitt bör skäras och plockas upp på objektglas. Objektglaset ska vara Superfrost Plus eller motsvarande. Studier indikerar att lufttorkade vävnadsnitt och cellinjesnitt som förvaras vid 2–8 °C är stabila i upp till 45 dagar. Varje laboratorie ska validera stabiliteten för snittat objektglas för sina egna procedurer och miljömässiga förvaringsförhållanden.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För användning vid in vitro-diagnostik (IVD).
2. Endast för yrkesmässigt bruk.
3. Använd inte fler gånger än det angivna antalet tester.
4. Positivt laddade objektglas kan vara känsliga för miljöpåverkan vilket kan leda till felaktig färgning. Be din servicerepresentant från Roche om mer information om hur denna typ av objektglas ska användas.
5. Material av humant eller animaliskt ursprung ska hanteras som biologiskt farligt avfall och omhändertas i enlighet med tillämpliga försiktighetsåtgärder. Vid exponering ska de ansvariga myndigheternas hälsodirektiv följas.^{30,31}
6. Undvik att reagenser kommer i kontakt med ögon och slemhinnor. Om reagenser kommer i kontakt med känsliga områden ska dessa sköljas med stora mängder vatten.
7. Undvik mikrobiell kontaminering av reagenser eftersom det kan orsaka felaktiga resultat.
8. Vid användning enligt instruktionerna klassificeras inte denna produkt som ett farligt ämne. Konserveringsmedlet i reagenset är natriumazid. Symtom på överexponering för natriumazid inkluderar hud- och ögonirritation och irritation av slemhinnor och övre luftvägar. Koncentrationen av natriumazid i denna produkt är 0.05 % och uppfyller inte kriterierna för ett farligt ämne. Uppbyggnad av NaN₃ kan reagera med bly- och kopparrör för att bilda mycket explosiva metallazider. Vid kassering, spola med stora volymer vatten för att förhindra azidansamling i rören.³² Systemiska allergiska reaktioner är möjliga hos känsliga individer.
9. Ytterligare information om användningen av den här enheten finns i användarhandboken för BenchMark IHC/ISH-instrumentet och bruksanvisningarna för alla nödvändiga komponenter på navifyportal.roche.com.
10. Kontakta lokala och/eller statliga myndigheter angående rekommenderad metod för avfallshantering.
11. Produktsäkerhetsmärkningsen följer främst EU:s GHS-vägledning. Säkerhetsdatablad finns tillgängligt för professionella användare på begäran.
12. För att rapportera misstänkta allvarliga händelser relaterade till den här enheten ska man kontakta den lokala Roche-representanten och den behöriga myndigheten i den medlemsstat eller land där användaren är etablerad.

FÄRGNINGSPROCEDUR

VENTANA-primärantikroppar har tagits fram för användning på BenchMark IHC/ISH-instrument tillsammans med VENTANA-detektionskit och -tillbehör. Se tabellerna nedan för rekommenderade färgningsprotokoll.

Denna antikropp har optimerats för specifika inkubationstider, men användaren måste validera resultat som erhålls med detta reagens.

Parametrarna för de automatiserade procedurerna kan visas, skrivas ut och redigeras i enlighet med metoden i instrumentets användarhandbok. Se lämpligt metodblad för *ultraView DAB Detection Kit* för ytterligare information om IHC-färgningsprocedurer.

Mer information om korrekt användning av denna enhet finns i inline dispenser-metodbladet som är associerat med art.nr 790-7167.

OBS! Färgningsprocedurer sammanfattas i Tab. 1 (För bedömning av HER2-positivitet och HER2-låg i bröstcancerfall), Tab. 2 (För bedömning av enbart HER2-positivitet i bröstcancerfall) och Tab. 3 (För bedömning av HER2-positivitet i magcancerfall).

Rekommenderade färgningsprotokollsteg, inklusive cellkonditionering och inkubation av antikropp är samma för all HER2-bröstcancerscreening. Färgningsprotokollen har dock varierande tillgängliga nivåer av användarändringar. Vid screening av patienter för bedömning av potentiell HER2-låg måste färgningsproceduren i Tab. 1 användas. Om avsikten kan inkludera att rapportera ut HER2-låg status (definieras som IHC-poäng på 1+ eller 2+ med en bekräftad HER2 icke amplifierad status) måste färgningsproceduren som listas i Tab. 1 användas. Om avsikten endast är att rapportera ut HER2-positivitetstatus (definieras som IHC-poäng på 3+ eller 2+ med en bekräftad HER2-amplifierad status) kan procedurerna i Tab. 1 eller Tab. 2 användas. För att tillse den mest omfattande användningen av resultat för antingen HER2-låg eller HER2-positivitetstatus hos bröstcancerfall så rekommenderar vi starkt att färgningsproceduren som listas i Tab. 1 används.

Färgningsprocedur för alla HER2-bedömningar inklusive potentiell HER2-låg bedömning för bröstcancerprover

Det färgningsprotokoll och den procedur som listas i det här avsnittet och Tab. 1 lämpar sig för användning i all HER2-screening av bröstcancerfall och måste användas vid bedömning av patientprover för potentiell HER2-låg behandling. Avvikelse från rekommenderade färgningsprotokoll kan ge upphov till oacceptabla HER2-färgade prover med en ändrad HER2-poäng, särskilt i fall med lågt HER2-uttryck (IHC 1+). Minskade och ökade cellkonditioneringstider ger sannolikt upphov till HER2-färgade prover med ändrade HER2-poäng vilket kan resultera i olämpliga behandlingsbeslut för patienter. De färgningsprocedurer som listas i Tab. 1 tillåter inte ändring av tider för cellkonditionering eller antikroppsinkubation för att hjälpa att avhjälpa den här risken eftersom det är det enda färgningsprotokoll som validerats för användning vid bedömning av potentiellt HER2-låga patientprover.

Tab. 1. Färgningsprotokoll för VENTANA HER2 (4B5)-analysen för alla HER2-bedömningar för bröstcancerprover inklusive potentiell HER2-låg bedömning på ett BenchMark IHC/ISH-instrument.

Procedurtyp	Metod		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA eller BenchMark ULTRA PLUS
Färgningsprocedur	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Antikropp (primär)*	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.
Kontrastfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter		
Efter kontrastfärgning	Bluing, 4 minuter		

* Detta är ett förprogrammerat villkor och är inte ett steg som användaren kan välja.

Alternativa färgningsprocedurer som endast gäller för bedömning av potentiell HER2-positivitet för bröst- och magprover

De färgningsprocedurer och protokoll som listas i Tab. 2 och Tab. 3 är avsedda för användning vid bedömning av HER2-positivitet (definieras som proteinöveruttryck, IHC-poäng på 3+ eller 2+ (med bekräftad HER2-amplifierad status) och inte vid bedömning av HER2-låg uttryck (definieras som IHC-poäng 1+ eller 2+ (med bekräftad HER2 icke amplifierad status)). De rekommenderade tiderna för cellkonditionering och antikroppsinkubation som anges i Tab. 2 och Tab. 3 är inte låsta och kan ändras av användaren. Potentiella orsaker för att ändra parametrarna inkluderar variationer i vävnadsfixering och -bearbetning (avvikelse från rekommenderad fixering eller bearbetning av prover), allmänna förhållanden för labbinstrument och miljöförhållanden, samt läsaens önskemål. Ytterligare information om fixeringsvariabler finns i "Immunohistochemistry Principles and Advances".³³ Användare som avviker från rekommenderade färgningsprotokoll ansvarar för tolkning och validering av patientresultat.

Tab. 2. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA HER2 (4B5) -analysen med ultraView DAB Detection Kit i bröstcancerprover på ett BenchMark IHC/ISH-instrument.

Procedurtyp	Metod		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA eller BenchMark ULTRA PLUS
Färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur
Avparaffinering	Vald	Vald	Vald
Cell Conditioning (Antigendemaskering)	CC1, Mild	CC1, Mild	ULTRA CC1, Mild
Antikropp (primär)	16 minuter, 37 °C	16 minuter, 37 °C	12 minuter, 36 °C
ultraWash	Vald		
Kontrastfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter		
Efter kontrastfärgning	Bluing, 4 minuter		

Tab. 3. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA HER2 (4B5)-analysen med ultraView DAB Detection Kit vid magprover på ett BenchMark IHC/ISH-instrument.

Procedurtyp	Metod		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur	ultraView DAB-färgningsprocedur
Avparaffinering	Vald	Vald	Vald
Cell Conditioning (Antigendemaskering)	CC1, Mild	CC1, Mild	ULTRA CC1, Mild
Antikropp (primär)	16 minuter, 37 °C	16 minuter, 37 °C	12 minuter, 36 °C
ultraWash	Vald		
Kontrastfärgning	Hematoxylin II, 4 minuter		
Efter kontrastfärgning	Bluing, 4 minuter		

PROCEDURER FÖR KVALITETSKONTROLL

Cellinjekontroller

Ventana har som separat produkt fyra formalinfixerade paraffinbäddade cellinjekontroller, snittade och placerade på ett enda laddat objektglas. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (P/N 781-2991) kan vara användbart för preliminär validering av den instrument- eller bearbetningsmetod som används vid färgning av objektglas med VENTANA HER2 (4B5) Assay. Dessa fyra cellinjekontroller karaktäriseras av *in situ*-hybridisering för genkopieringsnummer, Tab. 4. När de bearbetas och färgas på lämpligt sätt bör cellinjerna färgas enligt beskrivningen i metodbladet för PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Om den angivna färgningen inte syns i lämpliga snitt, särskilt kontrollerna 1+ och 2+, bör färgningen av vävnaderna upprepas.

Tab. 4. Egenskaper hos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

HER2 IHC-poäng	Cellinje	HER2/Chr17-kvot*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* HER2/Chr17-förhållandet är ett genomsnitt av tre loter av PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides som bestämts vid *in situ*-hybridisering med fluorescens (FISH).

POSITIV VÄVNADSKONTROLL

En positiv kontrollvävnad fixerad och bearbetad på samma sätt som patientproverna måste köras för varje uppsättning testvillkor och med varje utförd färgningsprocedur på VENTANA HER2 (4B5) Assay. Optimal laboratoriepraxis använder ett positivt kontrollsnitt på samma objektglas som testvävnad. Detta bidrar till att identifiera eventuella fel som gäller för reagenserna i objektglaset. Vävnad med svag positiv färgning är mer lämpad för optimal kvalitetskontroll. Kontrollvävnad kan innehålla både positiva och negativa färgningselement och fungera som både positiv och negativ kontroll. Kontrollvävnad bör utgöras av färsk obduktions-, biopsi- eller kirurgiska prover, vilka preparerats eller fixerats så tidigt som möjligt på ett sätt som är identiskt med behandlingen av testsnitten. Sådan vävnad kan utgöra kontroll för alla steg i analysen, från vävnadsberedning till färgning. Användning av ett vävnadssnitt som är fixerat eller bearbetat på ett annat sätt än testprovet utgör kontroll för alla reagens- och metodsteg utom fixering och vävnadsberedningen. Helst bör vävnad, som är känd för att ha svag men positiv färgning, väljas för att säkerställa att systemet är känsligt för små mängder reagensnedbrytning eller problem med IHC-metoden. I allmänhet är dock neoplastisk vävnad som är positiv för HER2 starkt positiv på grund av patologins natur (överuttryck).

Kända positiva vävnadskontroller bör endast användas för att övervaka korrekt prestanda för reagenser och instrument, inte som hjälpmedel vid fastställande av en specifik diagnos för testprov. Om de positiva vävnadskontrollerna inte uppvisar positiv färgning, bör testprovets resultat anses ogiltiga.

Ett exempel på en positiv kontroll för VENTANA HER2 (4B5) Assay är ett kändt svagt HER2-positivt invasivt bröstkarinom eller ett känt svagt positivt prov av magkarinom. De positivt färgade vävnadskomponenterna (membranfärgning av neoplastiska celler) används för att bekräfta att antikroppen applicerades och instrumentet fungerade korrekt.

Negativ vävnadskontroll

Samma objektglas som används för den positiva vävnadskontrollen (duktalt eller lobulärt invasivt bröstkarinom eller gastriskt karinom) kan användas som negativ vävnadskontroll. De icke-färgande komponenterna (omgivande stroma, lymfoidceller och blodkärl) bör visa frånvaro av specifik färgning och ge en indikation på specifik bakgrunds-färgning (falskt positiv) med primärantikroppen. Använd en känd negativ vävnad som fixerats, behandlats och bäddats in på exakt samma sätt som patientprovet.

Negativ reagenskontroll

En negativ reagenskontroll måste köras för varje prov för att underlätta tolkningen av resultaten. En negativ reagenskontroll används i stället för primärantikroppen för att utvärdera icke-specifik färgning. Objektglaset bör vara färgat med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubationsperioden för den negativa reagenskontrollen bör vara samma som primärantikroppens inkubationsperiod.

Oförklarliga avvikelser

Oförklarliga avvikelser i kontrollerna bör omedelbart rapporteras till din lokala supportrepresentant. Om kvalitetskontrollresultaten inte uppfyller specifikationerna är patientresultaten ogiltiga. Se felsökningsavsnittet. Identifiera och åtgärda problemet och upprepa sedan patientproverna.

Analysverifiering

Före den första användningen av en antikropp eller ett färgningssystem i en diagnostisk procedur bör antikroppens specificitet verifieras genom att testa den på en serie vävnader med kända immunhistokemiska prestandaegenskaper som representerar kända positiva och negativa vävnader (se avsnittet Procedurer för kvalitetskontroll tidigare beskrivits i detta avsnitt av produktinformationen och rekommendationerna för kvalitetskontroll från College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology

Checklist,³⁴ eller CLSI Approved Guideline³⁵ eller båda dokumenten). Dessa procedurer för kvalitetskontroll ska upprepas för varje ny antikroppslot eller när det sker en ändring av analysparametrar. Vävnad med bröstcancer och gastrisk cancer med känd HER2-status är lämplig för analysverifiering.

TOLKNING AV FÄRGNINGRESULTAT/FÖRVÄNTADE RESULTAT

VENTANA-automatiserad immunfärgningsprocedur gör att en brunfärgad (DAB)-reaktionsprodukt fälls ut vid de antigenplatser som lokaliserats av VENTANA HER2 (4B5) Assay. En kvalificerad patolog med erfarenhet av immunhistokemiska procedurer måste utvärdera kontrollerna och kvalificera den färgade produkten innan resultaten tolkas.

Positiva kontroller

Den färgade positiva vävnadskontrollen bör undersökas först för att säkerställa att alla reagenser fungerar korrekt. Förekomsten av en lämpligt färgad reaktionsprodukt i membranet hos målcellerna är en indikation på positiv reaktivitet. Beroende på inkubationslängden och styrkan hos det använda hematoxylinet kommer kontrastfärgning att resultera i en blek till mörkblå färgning av cellkärnor. Överdriven eller ofullständig kontrastfärgning kan förhindra korrekt tolkning av resultat.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning, bör alla testprovernas resultat anses ogiltiga.

Negativa vävnadskontroller

Den negativa vävnadskontrollen bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att verifiera den specifika märkningen av målantigenet med primärantikroppen. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar avsaknad av korsreaktivitet för antikropp för celler eller cellulära komponenter. Om vävnaden är kontrastfärgad kan det finnas fläckar runt utsidan av cellen, dvs de interstitiella utrymmena. Om specifik färgning inträffar på den negativa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientproverna betraktas som ogiltiga.

Negativa reagenskontroller

Icke-specifik färgning, om sådan förekommer, kommer att ha ett diffust utseende. Sporadisk ljus färgning av bindväv kan också observeras i vävnadssnitt som är alltför formalinfixerade. Intakta celler ska användas för tolkning av färgningsresultaten, eftersom nekrotiska eller degenererade celler ofta färgas ospecifikt.

Patientvävnad

Patientprover ska undersökas sist. Positiv färgningsintensitet bör bedömas inom ramen för eventuell bakgrunds-färgning av den negativa reagenskontrollen. Som med alla immunhistokemiska test betyder ett negativt resultat att antigenet i fråga inte detekterades, inte att antigenet inte fanns i cellerna eller analyserad vävnad. Morfologin för varje vävnadsprov bör också undersökas med hjälp av en hematoxylin- och eosinfärgade snitt vid tolkning av eventuella immunhistokemiska resultat. Patientens morfologiska resultat och relevanta kliniska data måste tolkas av en kvalificerad patolog.

En kvalificerad patolog med erfarenhet av immunhistokemiska procedurer måste utvärdera positiva och negativa kontroller och kvalificera den färgade produkten innan resultaten tolkas.

Poängsättningskonventioner för tolkning av VENTANA anti-HER2 (4B5) Antibody i bröstkarinom

Följande tabeller visar färgningskriterier. Se Tolkningssguide för VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx för bröst- och magcancer (art.nr 1021957SV) för en mer detaljerad beskrivning med bilder av färgning med VENTANA HER2 (4B5)-analysen.

Tab. 5. Kriterierna för intensitet och mönster i cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5)-analysen i bröstkarinon vid användning av färgningsproceduren i Tab. 1.

Färgningsmönster	HER2 (4B5)-poäng (rapportera till behandlande läkare)	Använda färgningsproceduren i Tab. 1: Rekommenderad rapporteringsstatus	Klinisk tillämpning
Ingen membranfärgning observerad eller, Svag, partiell färgning av membranet i 10 % eller färre av cancercellerna	0	HER2-negativt	Ingen
Svag, partiell färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	1+	HER2-lågt uttryck	ENHERTU® (trastuzumab deruxtecán)
Svag till måttligt fullständig färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	2+* Reflextest: HER2 icke-amplifierad	HER2-lågt uttryck	
	2+* Reflextest: HER2-amplifierad	HER2-positivt/överuttryck	
Intensiv fullständig färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	3+	HER2-positivt/överuttryck	KADCYLA (trastuzumab emtansin)

* Rekommendera reflextest för att bedöma genamplifiering enligt ASCO/CAP-riktlinje

Tab. 6. Kriterierna för intensitet och mönster i cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5) RxDx-analysen i bröstkarinon vid användning av färgningsproceduren i Tab. 2.

Färgningsmönster	HER2 (4B5)-poäng (rapportera till behandlande läkare)	Använda färgningsproceduren i Tab. 2: Rekommenderad rapporteringsstatus	Klinisk tillämpning
Ingen membranfärgning observerad eller, Svag, partiell färgning av membranet i 10 % eller färre av cancercellerna	0	HER2-negativt	Ingen
Svag, partiell färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	1+	HER2-negativt	
Svag till måttligt fullständig färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	2+* Reflextest: HER2 icke-amplifierad	HER2-negativt	
	2+* Reflextest: HER2-amplifierad	HER2-positivt/överuttryck	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab),

Färgningsmönster	HER2 (4B5)-poäng (rapportera till behandlande läkare)	Använda färgningsproceduren i Tab. 2: Rekommenderad rapporteringsstatus	Klinisk tillämpning
Intensiv fullständig färgning av membranet i mer än 10 % av cancercellerna	3+	HER2-positivt/överuttryck	KADCYLA (trastuzumab emtansin)

* Rekommendera reflextest för att bedöma genamplifiering enligt ASCO/CAP-riktlinje

Poängsättningskonventioner för tolkning av VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp vid magkarcinom

Gastriska karcinom som anses vara positiva för HER2-proteinöveruttryck måste uppfylla tröskelkriterierna för intensitet och mönster vid membranfärgning (2+ eller större på en skala från 0 till 3+) och för procenten positiva tumörceller. Färgningen måste lokaliseras till cellmembranet men behöver inte vara fullständigt periferisk eftersom basolateral färgning ofta observeras och bör övervägas vid poängsättning. Färgning av cytoplasma och/eller kärnor kan förekomma, men denna färgning ingår inte i bestämningen av positivitet. Vid gastriskt karcinom beror procenten positiva tumörceller på huruvida provet är ett biopsiprover (≥ 5 kohesiva celler) eller ett resektionsprov (≥ 10 %).

Vid fastställande av riktlinjer för värdering för HER2 immunhistokemi vid gastrisk cancer ska det observeras att medan stark membranfärgning är bevis på HER2-proteinöveruttryck i neoplastiska celler, så behöver den inte vara helt periferisk.³⁶ Diffus cytoplasmisk färgning med eller utan nukleär färgning vid magcancer har rapporterats.³⁷ Endast membranfärgning ska användas vid bestämning av HER2-proteinuttryck vid magcancer.

Immunhistokemisk färgning med klon 4B5 kan producera cytoplasmisk och nukleär färgning av normal gastrisk slemhinna och mer sällan av neoplastiska celler i gastriskt karcinom och karcinom i den esofagogastriska forbindelsen. Denna cytoplasmiska och nukleära färgnings natur är för närvarande okänd. Detta färgningsmönster bör inte sammanblandas med den diskreta membranfärgningen, eftersom den är indikativ för HER2-positivitet i neoplastiska celler.

Se Tolkningssguide för VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx för bröst- och magcancer (art.nr 1021957SV) för en mer detaljerad beskrivning med fotomikrografier av färgning med VENTANA HER2 (4B5)-analysen.

Tab. 7. Kriterierna för intensitet och mönster på cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5)-analysen i gastriskt karcinom vid användning av färgningsproceduren i Tab. 3.

Färgningsmönster – resektionsprov	Färgningsmönster – biopsiprov	Poäng (rapportera till behandlande läkare)	Bedömning av HER2-färgning	Klinisk tillämpning
Ingen reaktivitet eller membranreaktivitet i < 10 % av tumörcellerna	Ingen reaktivitet eller membranreaktivitet i någon tumörcell	0	HER2-negativt	Ingen
Svag/knappt märkbar membranreaktivitet i ≥ 10 % av tumörcellerna; cellerna är endast reaktiva i en del av membranet	Tumörcellskluster* med en svag/knappt märkbar membranreaktivitet oberoende av procentandel färgade tumörceller	1+	HER2-negativt	
Svag till måttlig fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i ≥ 10 % av tumörcellerna	Tumörcellskluster* med en svag till måttlig fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i oberoende av procentandel färgade tumörceller	2+** Reflextest: HER2 icke-amplifierad	HER2-negativt	
		2+** Reflextest: HER2-amplifierad	HER2-positivt/överuttryck	HERCEPTIN (trastuzumab)
Stark fullständig, basolateral eller lateral membran reaktivitet i ≥ 10 % av tumörcellerna	Tumörcellskluster* med en stark fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i oberoende av procentandel färgade tumörceller	3+	HER2-positivt/överuttryck	

* ≥ 5 kohesiva celler

** Rekommendera reflex till ISH

BEGRÄNSNINGAR

Allmänna begränsningar

- Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialutbildning i valet av lämpliga reagenser, vävnadssnitt, fixering, bearbetning, beredning av det immunhistokemiska objektglaset och tolkning av färgningsresultaten.
- Vävnadsfärgning är beroende av hantering och behandling av vävnaden innan färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, bindande antikroppar eller falska negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan fås vid variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder eller från inneboende oregelbundenheter i vävnaden.
- Överdriven eller ofullständig kontrastfärgning kan förhindra korrekt tolkning av resultat.
- Den kliniska tolkningen av positiv färgning eller frånvaro därav, måste utvärderas inom ramen för klinisk historik, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av eventuell färgning eller frånvaro därav, måste kompletteras med morfologiska studier och korrekta kontroller samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patologs ansvar att känna till antikropparna, reagenserna och metoderna som används för att tolka det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat licensierat laboratorium under överinseende av en patolog som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att de positiva och negativa kontrollerna är tillräckliga.
- Antikroppar och reagenser från VENTANA tillhandahålls med optimal utspädning för användning när de medföljande instruktionerna följs. Avvikelser från rekommenderade testförfaranden kan ogiltigförklara förväntade resultat. Lämpliga kontroller måste användas och dokumenteras. Användare som avviker från rekommenderade testförfaranden måste ta ansvar för tolkningen av patientresultaten.
- Denna produkt är inte avsedd för användning i flödescytometri, prestandaegenskaper har inte fastställts.
- Reagenser kan visa oväntade reaktioner i tidigare otestade vävnader. Risken för oväntade reaktioner även i testade vävnadsgrupper kan inte elimineras fullständigt på grund av biologisk variation av antigenuttryck i neoplasmer eller andra patologiska vävnader.³⁸ Kontakta din lokala supportrepresentant med dokumenterade oväntade reaktioner.

- Vävnader från personer som är infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatit B-tytanten (HBsAg) kan uppvisa icke-specifik färgning med pepparrotsperoxidas.³⁹
- Falska positiva resultat kan ses på grund av icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av pseudoperoxidasaktivitet (erythrocyter), endogen peroxidasaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (till exempel: lever, hjärna, bröst, njure), beroende på vilken typ av immunfärgning som använts.⁴⁰
- Som med alla immunhistokemiska test betyder ett negativt resultat att antigenet i fråga inte detekterades, inte att antigenet inte fanns i cellerna eller analyserad vävnad.

Specifika begränsningar

- Denna antikropp har optimerats som det anges i Tab. 1 och Tab. 2 för BenchMark-instrument och detektionskemi. Avvikelse från rekommenderade färgningsprotokoll i Tab. 1 och Tab. 2 kan ge upphov till oacceptabla Negative Reagent Control (NRC)-prover och VENTANA HER2 (4B5) Assay-färgade prov med en ändrad HER2-poäng. Ökad inkubationstid för antikroppen skapar sannolikt oacceptabel färgning i NRC vilket skulle förhindra att VENTANA HER2 (4B5) Assay-provet utvärderas. Minskade och ökade cellkonditioneringstider ger sannolikt upphov till VENTANA HER2 (4B5) Assay-prover med ändrade HER2-poäng vilket kan resultera i olämpliga behandlingsbeslut för patienter. Ytterligare information om fixeringsvariabler finns i "Immunohistochemistry Principles and Advances".³³
- Antikroppen, i kombination med VENTANA-detektionskit och tillbehör, detekterar antigen som överlever en rutin av formalinfixering, vävnadsbearbetning och snittning. Användare som avviker från rekommenderade testförfaranden är ansvariga för tolkningen och valideringen av patientresultaten.
- Objektglas bör färgas omgående eftersom antigenicitet hos ett skuret vävnadssnitt kan minska med tiden och kan försämrats på grund av miljöfaktorer under förlängd förvaring. Lufttorkade objektglas ska torkas ut och förvaras i 2–8 °C. Studier ger stöd för minst 45 dagars stabilitet för antigen på ej färgade objektglas. Laboratorier bör validera datering av förfallodatum i sin egen miljö om de önskar datera utöver 45 dagar.
- Benmärg testades inte för specificitet. Användaren bör fastställa lämplig färgning i ovanstående vävnad före tolkning av färgningsinformation.
- Immunhistokemisk färgning med klon 4B5 kan producera cytoplasmisk och nukleär färgning av normal gastrisk slemhinna och mer sällan av neoplastiska celler i

gastriskt karcinom och karcinom i den esofagogastriska förbindelsen. Denna cytoplasmiska och nukleära färgnings natur är för närvarande okänd. Detta färgningsmönster bör inte sammanblandas med den diskreta membranfärgningen, den är indikativ för HER2-positivitet i neoplastiska celler.

6. Alla analyser kanske inte registreras på varje instrument. Kontakta din lokala Roche-representant för mer information.
7. Ändringar av HER2-status har rapporterats vid metastatisk progression eller efter neoadjuvant kemoterapi. Baserat på dessa observationer kan det vara klokt att ta ett färskt prov för bestämning av HER2-status vid behandlingstillfället i stället för att förlita sig på historisk HER2-status.⁴¹

PRESTANDAEGENSKAPER

Färgningstester för sensitivitet, specificitet och precision utfördes och resultaten sammanfattas nedan.

ANALYTISK PRESTANDA

Sensitivitet och specificitet

Sensitivitet/specificitet för VENTANA HER2 (4B5) Assay fastställdes med en studie som inte uppvisade någon specifik membranfärgning för de flesta normala vävnader. Resultaten anges i Tab. 8. Sensitivitet och specificitet för VENTANA HER2 (4B5) Assay bestämdes även genom en studie som inte uppvisade någon specifik membranfärgning i de flesta neoplastiska vävnader. Färgningsresultaten anges i Tab. 9. Färgning för sensitivitet och specificitet utfördes med IVIEW DAB Detection Kit-protokollet på ett BenchMark XT-instrument eller *ultraView* Universal DAB Detection Kit-protokollet på ett BenchMark ULTRA-instrument.

Positiv färgning i tonsillepitel, esofagusepitel, prostata, urinblåsa, perifer nerv, bisköldkörtel, bröstcancer, adenokarcinom i mage, kolon äggstockscancer är konsekvent med publicerad litteratur om uttryck av HER2

Tab. 8. Sensitivitet/specificitet för VENTANA HER2 (4B5)-analysen fastställdes genom att testa normala FFPE-vävnader.

Vävnad	Antal positiva/totala fall	Vävnad	Antal positiva/totala fall
Cerebrum	0/6	Tunntarm	0/6
Cerebellum	0/6	Kolon	0/46
Binjure	0/6	Lever	0/6
Äggstock	0/6	Spottkörtel	0/3
Bukspottkörtel	0/6	Tunga	0/3
Lymfkörtel	0/12	Njure	0/6
Hypofys	0/5	Prostata	1/6
Testikel	0/6	Urinblåsa ^b	3/3
Sköldkörtel	0/6	Rektum	0/6
Bröst	0/14	Bisköldkörtel ^c	4/6
Mjälte	0/6	Endometrium	0/3
Tonsill ^a	3/6	Livmoder	0/3
Thymus	0/5	Cervix	0/5
Benmärg	0/3	Endocervix	0/1
Lunga	0/6	Skelettmuskulatur	0/6
Hjärta	0/5	Hud	0/6
Hjärtasäck	0/3	Nerv	2/6
Esofagus	1/6	Mesotel	0/3

Vävnad	Antal positiva/totala fall	Vävnad	Antal positiva/totala fall
Magsäck	0/11	Ej tillgängligt	Ej tillgängligt

^a fokal färgning av ytliga epitelceller

^b membranfärgning av ytliga paraceller

^c fokal membranfärgning

Tab. 9. Sensitivitet/specificitet för VENTANA HER2 (4B5)-analysen fastställdes genom att testa olika neoplastiska FFPE-vävnader.

Patologi	Antal positiva/totala fall
Glioblastom (cerebrum)	0/2
Meningiom (cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	0/1
Seröst adenokarcinom (äggstock)	0/2
Karcinom, NOS (utan närmare specifikation) (äggstock)	1/2
Neuroendokrin neoplasia (bukspottkörtel)	0/1
Adenokarcinom (bukspottkörtel)	0/1
Karcinom, NOS (bukspottkörtel)	0/3
Seminom (testikel)	0/1
Embryonalt karcinom (testikel)	0/1
Medullärt karcinom (sköldkörtel)	0/1
Papillärt karcinom (sköldkörtel)	0/1
Karcinom, NOS (sköldkörtel)	0/3
Mikroinvasivt duktalt karcinom (bröst)	2/2
Invasivt duktalt karcinom (bröst)	44/98
Karcinom, NOS (bröst)	1/4
Småcelligt karcinom (lunga)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (lunga)	0/1
Karcinom, NOS (lunga)	0/2
Adenokarcinom (lunga)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (esofagus)	0/1
Adenokarcinom (esofagus)	0/1
Mucinöst adenokarcinom (mage)	0/4
Adenokarcinom (mage)	8/88
Signetringcellskarcinom (mage)	0/4
Karcinom, NOS (magsäck)	0/3
Adenokarcinom (tunntarm)	0/1
Gastrointestinal stromacellstumör (tunntarm)	0/1
Adenokarcinom (kolon)	0/32
Gastrointestinal stromacellstumör (kolon)	0/1
Karcinom, NOS (kolon)	1/3
Adenokarcinom (rektum)	1/5
Gastrointestinal stromacellstumör (rektum)	0/1

Patologi	Antal positiva/totala fall
Melanom (rektum)	0/1
Hepatocellulärt karcinom (lever)	0/3
Hepatoblastom (lever)	0/1
Karcinom, NOS (lever)	0/3
Klarcellskarcinom (njure)	0/1
Karcinom, NOS (njure)	0/5
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Karcinom, NOS (prostata)	0/3
Leiomyom	0/3
Adenokarcinom (livmoder)	0/1
Klarcellskarcinom (livmoder)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (cervix)	0/2
Embryonalt rabdomyosarkom (striated muskulatur)	0/1
Basalcellskarcinom (hud)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (hud)	1/1
Neurofibrom (låndrygg)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mesoteliom (bukhinna)	0/1
Pleomorft rabdomyosarkom (bukhinna)	0/1
Lymfom, NOS	0/3
B-cellslymfom, NOS (mjälte)	0/1
B-cellslymfom, NOS (lymfkörtel)	0/2
Hodgkins lymfom (lymfkörtel)	0/1
Urotelialt karcinom (urinblåsa)	1/1
Leiomyosarkom (urinblåsa)	0/1
Osteosarkom (ben)	0/1
Leiomyosarkom (glatt muskulatur)	0/1
Adenokarcinom från rektum (metastatiskt)	0/1
Adenokarcinom från kolon (metastatiskt)	0/7
Mucinöst adenokarcinom från kolon (metastatiskt)	0/1
Melanom	0/2
Neuroendokrin neoplasm, NOS	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Odifferentierat karcinom, NOS	0/1

Analytisk prestanda i HER2-låg-bröstcancer

Repetierbarhet och mellanliggande precision för HER2-låg på BenchMark ULTRA
Tjugofyra fall med bröstcancer över hela HER2 IHC-färgningsintervallet inkluderades i repetierbarhet och mellanliggande precisionsstudien. Studiens utformning verifierade färgningsprecision för bröstcancerovävnader som färgats med VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Tre loter med VENTANA HER2 (4B5) Assay (mellan antikroppslot)

Tre loter med *ultraView* DAB IHC Detection Kit (mellan detektionskitlot)

För tre dagar (mellan dagar)

Tre BenchMark ULTRA-instrument (mellan instrument)

Över alla förhållanden med mellanliggande precision (inom körning)

Varje prov tilldelades ett läge baserat på de prover som aggregerats per testförhållande för mellan antikroppsloter, mellan detektionskitlots, mellan instrument och mellan dagar. För förhållande inom körning jämfördes varje prov med sina duplicerade prover för varje testkörning. Alla objektglas var blindade och randomiserade och utvärderades därefter enligt kriterierna för intensitet och mönster på cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5) Assay-färgning (Tab. 5). Resultaten sammanfattas i Tab. 10.

Tab. 10. Repeterbarhet och mellanliggande precision för VENTANA HER2 (4B5) Assay på bröstcancerovävnader med HER2-låg poängsättning

Repetierbarhet/ Precision	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mellan antikroppsloter	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)
Mellan detektionskit	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)
Mellan instrument (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)
Mellan dagar	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)
Inom körning	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)

Obs! Positiv överensstämmelse i procent (PPA), Negativ överensstämmelse i procent (NPA), Övergripande överensstämmelse i procent (OPA).

Obs! Ett tvåsidigt konfidensintervall (CI) på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 bootstrap-prover. Konfidensintervall för 100 % PPA, NPA och OPA beräknades med Wilson score-metoden.

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för HER2-låg behandling enligt utformningen av den kliniska studien och HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för HER2-låg riktad behandling enligt studiens utformning.

Jämförelsestudie av BenchMark ULTRA med BenchMark XT och BenchMark GX avseende HER2-låg

Tio fall med bröstcancer över hela HER2 IHC-färgningsintervallet inkluderades i den mellanliggande precisionsstudien. Studiens utformning verifierade färgningsprecision för bröstcancerovävnader som färgats med VENTANA HER2 (4B5) Assay över flera instrument och flera plattformar.

Varje prov tilldelades ett läge baserat på de prover som aggregerats per testförhållande. Varje prov jämfördes med sina dublettprover för varje testkörning. Alla objektglas var blindade och randomiserade och utvärderades därefter enligt kriterierna för intensitet och mönster på cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5) Assay-färgning (Tab. 5). Resultaten sammanfattas i Tab. 11.

Tab. 11. Repeterbarhet och mellanliggande precision för VENTANA HER2 (4B5) Assay på bröstcancervävnader med HER2-låg poängsättning

Repetierbarhet/ Precision	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mellan plattformar (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)
Mellan instrument (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)
Mellan instrument (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)
Mellan instrument (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)

Obs! Positiv överensstämmelse i procent (PPA), Negativ överensstämmelse i procent (NPA), Övergripande överensstämmelse i procent (OPA).

Obs! Ett tvåsidigt konfidensintervall (CI) på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 bootstrap-prover. Konfidensintervall för 100 % PPA, NPA och OPA beräknades med Wilson score-metoden.

Obs! I studieanalyssyfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för HER2-låg behandling enligt utformningen av den kliniska studien och HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för HER2-låg riktad behandling enligt studiens utformning.

Läsarprecision för HER2-låg på BenchMark ULTRA

Precision mellan läsare och inom läsare bedömdes genom att utvärdera samstämmighet för HER2-låg status mellan tre läsare och inom tre individuella läsare. Studien inkluderade 100 fall av bröstcancer som sträckte sig utmed HER2 IHC-färgningsintervallet. Proverna blindades och randomiserades innan bedömning avseende HER2-låg status per mönster för cellmembranfärgning med VENTANA HER2 (4B5)-analysfärgning (Tab. 5). Läsare poängsatte alla prover två gånger med minst två veckor mellan avläsningarna.

Överensstämmelsen för precision mellan läsare och inom läsare sammanfattas i Tab. 12.

Tab. 12. Precision inom och mellan läsarprecision för VENTANA HER2 (4B5)-analysen med HER2-låg-poängsättning

Precision	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Inom läsare	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)
Mellan läsare	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)

Precision	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI

Obs! Genomsnittlig positiv överensstämmelse (APA), Genomsnittlig negativ överensstämmelse (ANA), Övergripande överensstämmelse i procent (OPA).

Obs! Ett tvåsidigt konfidensintervall (CI) på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 bootstrap-prover.

Obs! I studieanalyssyfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för HER2-låg behandling enligt utformningen av den kliniska studien och HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för HER2-låg riktad behandling enligt studiens utformning.

Reproducerbarhetsstudie mellan laboratorier för HER2-låg på BenchMark ULTRA

En studie av reproducerbarhet mellan laboratorier för VENTANA HER2 (4B5) Assay utfördes för att demonstrera reproducerbarhet för analysen vid bedömning av HER2-låg status för fall av bröstcancer. Studien inkluderade 28 identifierade, arkiverade FFPE-bröstcancerprov som kördes i tre olika BenchMark ULTRA-instrument på vardera fem ej på varandra följande dagar under 20 dagar vid tre externa laboratorier. Proverna representerade färgningsintervallet för VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Varje uppsättning med 5 färgade objektglas per prov per färgningsdag randomiserades och bedömdes av sammanlagt 6 läsare (2 läsare/plats) för en HER2-låg status. HER2-låg statusresultaten för alla läsare, platser och dagar för proverna kombinerades och analyserades i förhållande till läsarens lägen för samma prover för att fastställa den totala reproducerbarheten för HER2-låg status. Sammanfattningen av överensstämmelsegraden för alla utvärderbara observationer med användning av avläsarlägen på provnivå för HER2-låg status som referens återfinns i Tab. 13.

Tab. 13. Reproducerbarhet mellan laboratorier för övergripande överensstämmelsegrad för VENTANA HER2 (4B5) Assay med HER2-låg poängsättning

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Övergripande	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)
Inom plats	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)
Inom läsare	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)

Obs! Positiv överensstämmelse i procent (PPA), Negativ överensstämmelse i procent (NPA), Övergripande överensstämmelse i procent (OPA).

Obs! Tvåsidigt konfidensintervall på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat

Obs! I studieanalyssyfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för HER2-låg-behandling enligt utformningen av den kliniska studien och HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för riktad HER2-låg-behandling enligt studiens utformning.

Dessutom gjordes parvisa jämförelser mellan platser, mellan läsare och mellan dagar för HER2-låg status. En sammanfattning av resultaten finns i Tab. 14. Dessa data indikerar analysreproducerbarheten under 5 dagar, 3 platser och med 6 avläsare.

Tab. 14. Reproducerbarhet mellan laboratorier parvis överensstämmelsegrad för VENTANA HER2 (4B5) Assay med HER2-låg poängsättning

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mellan platser	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)
Mellan läsare	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)
Mellan dagar	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)

Obs! Genomsnittlig positiv överensstämmelse (APA), Genomsnittlig negativ överensstämmelse (ANA), Övergripande överensstämmelse i procent (OPA).

Obs! Tvåsidigt konfidensintervall på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för HER2-låg behandling enligt utformningen av den kliniska studien och HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för HER2-låg riktad behandling enligt studiens utformning.

Analytisk prestanda i HER2-låg-bröstfall

Överensstämmelse mellan BenchMark ULTRA- och BenchMark ULTRA PLUS-instrument för HER2-låg

Tre laboratorier deltog i en överensstämmelsestudie för att utvärdera prestandaekvivalens mellan BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. För statistisk HER2-låg-analys valdes 160 (80 positiva och 80 negativa, inklusive 16 gränsfall) av fallen ut på förhand för analys innan patologiänsningar. Vävnadsobjektglas från alla fall färgades med negativ reagenskontroll och VENTANA HER2 (4B5)-analysen i ett internt Roche-laboratorium på ett BenchMark ULTRA-instrument med det rekommenderade färgningsprotokollet. Ofärgade vävnadsobjektglas från alla fall randomiserades och distribuerades jämnt för färgning på ett BenchMark ULTRA PLUS-instrument med det rekommenderade VENTANA HER2 (4B5)-färgningsprotokollet. Blindad till fallstatus läste en läsare per plats av de färgade BenchMark ULTRA PLUS-objektglaserna från deras plats och bestämde HER2 (4B5)-status. Resultaten analyserades av Roche. Resultaten sammanfattas i Tab. 15.

Tab. 15. Poolad överensstämmelse för HER2-låg status för fall som färgats med VENTANA HER2 (4B5)-analysen på BenchMark ULTRA- jämfört med BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Negativt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Negativt	Totalt
Positivt	272	13	25	11	321
Negativt	8	9	2	298	317
Summa	280	22	27	309	638
Procent Positiva % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	Ej tillgängligt
	n/N		% (95 % KI)		

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Negativt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Negativt	Totalt
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)	

Obs! PPA = Positiv överensstämmelse i procent; NPA = Negativ överensstämmelse i procent; OPA = Övergripande överensstämmelse i procent.

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån IHC-kvalificeringsbedömningsgrupp.

Obs! Den poolade överensstämmelsen inkluderade alla fall och ULTRA PLUS-läsare.

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för den kliniska studien som undersökte HER2-låg-bröstcancer. HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för den kliniska studien.

Studie av reproducerbarhet mellan laboratorier- BenchMark ULTRA PLUS för HER2-låg

En studie av reproducerbarhet mellan laboratorier för VENTANA HER2 (4B5) Assay utfördes för att demonstrera reproducerbarhet för analysen vid bedömning av HER2-låg status för fall av bröstcancer.

Studien inkluderade 28 avidentifierade, arkiverade FFPE-bröstcancerprov som kördes i tre olika BenchMark ULTRA PLUS-instrument på vardera fem ej på varandra följande dagar under 20 dagar vid tre externa laboratorier. Proverna representerade färgningsintervallet för VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Varje uppsättning med 5 färgade objektglas per prov per färgningsdag randomiserades och bedömdes av sammanlagt 6 läsare (2 läsare/plats) för en HER2-låg status. HER2-låg statusresultaten för alla läsare, platser och dagar för proverna kombinerades och analyserades i förhållande till läsarens lägen för samma prover för att fastställa den totala reproducerbarheten för HER2-låg status. Sammanfattningen av överensstämmelsegraden för alla utvärderbara observationer med användning av läsarlägen på provnivå för HER2-låg status som referens återfinns i Tab. 16.

Tab. 16. Reproducerbarhet mellan laboratorier för övergripande överensstämmelsegrader för VENTANA HER2 (4B5)-analysen i bröstcancer med HER2-låg-poängsättning.

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Primär analys/Övergripande	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)
Stratifierat efter plats	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)
Stratifierat efter läsare	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)

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknade med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån falllets kvalificeringsbedömningsgrupp.

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för den kliniska studien som undersökte HER2-låg-bröstcancer. HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för den kliniska studien.

Dessutom gjordes parvisa jämförelser av HER2 (4B5)-status mellan platser, mellan läsare och mellan dagar. Enligt sammanfattningen i Tab. 17 var analysen reproducerbar för 5 dagar, 3 platser och 6 läsare.

Tab. 17. Reproducerbarhet mellan laboratorier för parvis överensstämmelsegrader för VENTANA HER2 (4B5)-analysen i bröstkarinom med HER2-låg-poängsättning.

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mellan platser	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)
Mellan läsare	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)
Mellan dagar	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)

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknade med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån falllets kvalificeringsbedömningsgrupp

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2-poäng 0 och 3+ tillsammans som negativa fall eftersom de inte kvalificerade för den kliniska studien som undersökte HER2-låg-bröstcancer. HER2-poäng på 1+ och 2+ grupperades tillsammans som positiva fall eftersom de kvalificerade eller potentiellt kvalificerade för den kliniska studien.

Analytisk prestanda i HER2-positiva bröstfall

Överensstämmelse mellan BenchMark ULTRA- och BenchMark ULTRA PLUS-instrument för HER2-positiv

Tre laboratorier deltog i en överensstämmelsestudie för att utvärdera prestandaekivalens mellan BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet. För HER2-positiva analyser definieras HER2 IHC-poäng på 2+ eller 3+ som HER2-positiva och en poäng på 0 eller 1+ som HER2-negativa. För statistisk HER2-positiv analys valdes 160 (80 positiva och 80 negativa, inklusive 16 gränsfall) av fallen ut på förhand för analys innan patologiänsningar. Vävnadsobjektglas från alla fall färgades med negativ reagenskontroll och VENTANA HER2 (4B5)-analysen i ett internt Roche-laboratorium på ett BenchMark ULTRA-instrument med det rekommenderade färgningsprotokollet. Ofärgade vävnadsobjektglas från alla fall randomiserades och distribuerades jämnt för färgning på ett BenchMark ULTRA PLUS-instrument med det rekommenderade VENTANA HER2 (4B5)-färgningsprotokollet. Blindad till fallstatus läste en läsare per plats av de färgade BenchMark ULTRA PLUS-objektglasen från deras plats och bestämde HER2 (4B5)-status. Resultaten analyserades av Roche. Resultaten sammanfattas i Tab. 18.

Tab. 18. Poolad överensstämmelse för HER2-positiv status för fall som färgats med VENTANA HER2 (4B5)-analysen på BenchMark ULTRA- jämfört med BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				
	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Positivt, Extern läsare= Negativt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Positivt	Roche-läsare= Negativt, Extern läsare= Negativt	Totalt
Positivt	245	18	11	13	287
Negativt	6	13	5	327	351
Summa	251	31	16	340	638
Procent Positiva % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	Ej tillgängligt
	n/N		% (95 % KI)		
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)		

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknade med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån IHC-kvalificeringsbedömningsgrupp (0, 1+, 2+, 3+).

Obs! Den poolade överensstämmelsen inkluderade alla fall och ULTRA PLUS-läsare.

Obs! PPA = Positiv överensstämmelse i procent; NPA = Negativ överensstämmelse i procent; OPA = Övergripande överensstämmelse i procent.

Studie av reproducerbarhet mellan laboratorier- BenchMark ULTRA PLUS för HER2-positiv

En studie av reproducerbarhet mellan laboratorier för VENTANA HER2 (4B5)-analysen utfördes för att demonstrera reproducerbarhet av analysen för bedömning av HER2-positiv status för fall av bröstkarinom. Studien inkluderade 28 oidentifierade, arkiverade FFPE-bröstkarinomvävnadsprover som kördes i tre olika BenchMark ULTRA PLUS-instrument på vardera fem ej på varandra följande dagar under 20 dagar vid tre externa laboratorier. Proverna representerade färgningsintervallet för VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Varje uppsättning med 5 färgade objektglas per prov per färgningsdag randomiserades och bedömdes av sammanlagt 6 läsare (2 läsare/plats) för en HER2-positiv status. HER2-positiv-statusresultaten för alla läsare, platser och dagar för proverna kombinerades och analyserades i förhållande till läsarens lägen för samma prover för att fastställa den totala reproducerbarheten för HER2-positiv status. Sammanfattningen av överensstämmelsegraden för alla utvärderbara observationer med användning av läsarlägen på provnivå för HER2-positiv status som referens återfinns i Tab. 19.

Tab. 19. Reproducerbarhet mellan laboratorier för övergripande överensstämmelsegrader för VENTANA HER2 (4B5)-analysen i bröstkarinom med HER2-positiv poängsättning.

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Primär analys/Övergripande	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)
Stratifierat efter plats	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)

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Stratifierat efter läsare	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)

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknade med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån falllets kvalificeringsbedömningsgrupp

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2 IHC-poäng på 0 och 1+ samman som negativa och HER2 IHC-poäng på 2+ och 3+ grupperades samman som positiva.

Dessutom gjordes parvisa jämförelser av HER2 (4B5)-status mellan platser, mellan läsare och mellan dagar. Enligt sammanfattningen i Tab. 20 var analysen reproducerbar för 5 dagar, 3 platser och 6 läsare.

Tab. 20. Reproducerbarhet mellan laboratorier för parvis överensstämmelsegrader för VENTANA HER2 (4B5)-analysen i bröstcancer med HER2-positiv färgning.

Reproducerbarhet mellan laboratorier	Överensstämmelse			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mellan platser	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)
Mellan läsare	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)
Mellan dagar	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)

Obs! Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknade med hjälp av percentil bootstrap-metoden utgående från 2000 replikat stratifierade utifrån falllets kvalificeringsbedömningsgrupp

Obs! I studieanalys syfte grupperades HER2 IHC-poäng på 0 och 1+ samman som negativa och HER2 IHC-poäng på 2+ och 3+ grupperades samman som positiva.

Prestandaegenskaper på BenchMark ULTRA-instrument med iVIEW DAB Detection Kit eller **ultraView** Universal DAB Detection Kit

Färgning mellan laboratorier och reproducerbarhet mellan dagar på BenchMark ULTRA-instrumentet: Tre laboratorier, från separata institutioner i USA, deltog i den interlaboratoriella reproducerbarhetsstudien. Snitt på objektglas från 48 FFPE-invasiva bröstcancerfall [12 vardera från varje HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] och 1 par PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides per vardera 12 färgningskörningar distribuerades till studieplatser för färgning på ett BenchMark ULTRA-instrument med användning av rekommenderat färgningsprotokoll och **ultraView** Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides och ett andra objektglas för respektive fall, färgat med negativ Ig-reagens. Patologer som var blindade med avseende på fallstatus utvärderade bilderna och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultaten analyserades av Ventana. Med hjälp av standardnomenklatur för 2x2 tabeller beräknades genomsnittlig positiv överensstämmelse (APA) över platser som $[2a/(2a + b + c)]$ och genomsnittlig negativ överensstämmelse (ANA) som $[2d/(2d + b + c)]$. På alla platser var APA mellan platser baserat på klinisk bedömning (positivt, negativt) 90.0 % (108/120) och ANA var 92.9 % (156/168). För parvisa jämförelser av platser beräknades APA som $a/(a+c)$ och ANA beräknades som $d/(b+d)$. APA-förhållandet mellan platser var 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) och 89.5 % (34/38) för Plats A jämfört med Plats B, Plats A jämfört med Plats C och Plats B jämfört med Plats C. ANA-förhållandet mellan platser var

94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) och 93.1 % (54/58) för Plats A jämfört med Plats B, Plats A jämfört med Plats C och Plats B jämfört med Plats C.

Följande tabeller är 3x3-presentationer av resultat för respektive läsare baserat på kliniska värden där 2+ och 3+ separerades.

Tab. 21. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats A och Plats B – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med **ultraView** Universal DAB Detection Kit.

Plats A	Plats B			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Summa	12	9	27	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%) (95 % CI)				
43/48 (89.6) (77.8–95.5)				

Tab. 22. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats A och Plats C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med **ultraView** Universal DAB Detection Kit.

Plats A	Plats C			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Summa	12	5	31	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%) (95 % CI)				
42/48 (87.5) (75.3–94.1)				

Tab. 23. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats B och Plats C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med **ultraView** Universal DAB Detection Kit.

Plats B	Plats C			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Summa	12	5	31	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%) (95 % CI)				
44/48 (91.7) (80.4–96.7)				

Reproducerbarhet av färgning mellan dagar på BenchMark ULTRA-instrument

Delen om reproducerbarhet mellan dagar (IDR) i studien inkluderade 12 fall med en avsedd fördelning av cirka tre (3) fall vid varje klinisk värdering (0, 1+, 2+, 3+). Totalt genomfördes de fem körningarna på BenchMark ULTRA-instrumentet vid den enskilda institutionen (Plats C) som genomför IDR-delen av studien under minst 20 dagar, så att inte två färgningsdagar var i följd. APA- och ANA-värdena vid IDR baserade på klinisk bedömning av klon 4B5-färgning vid Plats C över alla dagar var båda 100 %. De övergripande överensstämmelse i procent (OPA) för jämförelser mellan dagar baserat på kliniska värden var 100 % för var och en av de dagliga jämförelserna och för alla dagar tillsammans.

Jämförelsestudie av BenchMark ULTRA-instrument och BenchMark XT-instrument
Två färgningslaboratorier och tre laboratorier i USA deltog i plattformsjämförelsestudien. Snitt på objektglas med 280 FFPE invasiva fall av bröstcancer [cirka 70 fall från varje HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] fördelades slumpmässigt till två färgningsplatser (140 fall till varje plats) för färgning på ett BenchMark XT-instrument och ett BenchMark ULTRA-instrument med respektive rekommenderade färgningsprotokoll och **ultraView** Universal

DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides och ett andra objektglas för respektive fall, färgat med negativ Ig-reagens. Färgade fall från Plats 1 och Plats 2 delades in i fyra objektglassatser och tillhandahölls, en uppsättning i taget, till tre olika kvalificerade läsare (patologer), en läsare på Plats 1, en på Plats 2 och en på Plats 3. Patologerna, som var blindade med avseende på fallstatus och färgningsplattform, utvärderade alla fyra uppsättningarna av objektglas och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+) för varje fall. Resultaten analyserades av Ventana. PPA-värdena (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikropps-färgning på BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) och 94.9 % (89.3) för Läsare A, B respektive C. NPA-värdena (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikropps-färgning på BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var 91.9 (85.8), 93.8 % (88.3) och 99.3 (96.3) för Läsare A, B respektive C. OPA mellan klon 4B5-färgning med BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på 2x2-analys av klinisk bedömning (positiva, negativa) var 91.8 %, 92.5 % och 97.4 % för Läsare A, B respektive C. 3x3-presentationen av överensstämmelsegrader mellan plattformar för varje läsare baserat på kliniskt värde (0/1+, 2+, 3+) visas i tabellerna nedan:

Tab. 24. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark ULTRA-instrument jämfört med BenchMark XT-instrument – Läsare A.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare A	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Summa	96	47	124	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 226/267 (84.6) (79.8–88.5) (%) (95 % CI)				

Tab. 25. BenchMark ULTRA-instrument kontra BenchMark XT-instrument överensstämmelsegrader mellan plattform 3x3-analys – läsare B.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare B	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Summa	69	68	130	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 242/267 (90.6) (86.5–93.6) (%) (95 % CI)				

Tab. 26. BenchMark ULTRA-instrument kontra BenchMark XT-instrument överensstämmelsegrader mellan plattform 3x3-analys – läsare C.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare C	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Summa	66	52	149	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 257/267 (96.3) (93.2–98.0) (%) (95 % CI)				

Reproducerbarhet av prover från instrumentjämförelsestudie mellan patologer
Positiva och negativa överensstämmelsegrader med dubbelsidigt 95 % värdekonfidensintervall beräknades för de sex möjliga parvisa jämförelserna mellan läsarna för varje plattform.

För BenchMark ULTRA-instrument var PPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) respektive 83.5 % (111/133). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) respektive 98.5 % (132/134). OPA-värdet var högst mellan Läsare A och Läsare B (91.8 %) och lägre mellan Läsare B och Läsare C (91.0 %) och Läsare A och Läsare C (88.8 %).

För BenchMark XT-instrument var PPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) respektive 84.7 % (116/137). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) respektive 98.5 % (128/130). OPA-värdet var högst mellan Läsare A och Läsare B (92.5 %) och lägre mellan Läsare B och Läsare C (91.4 %) och Läsare A och Läsare C (89.1 %).

Jämförelsestudie av iVIEW DAB Detection Kit och **ultraView** Universal DAB Detection Kit

Plats 1-kohorten på 140 FFPE invasiva bröstkarinomfall [ungefär 35 fall från respektive HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] användes i en jämförelsestudie av iVIEW DAB Detection Kit och **ultraView** Universal DAB Detection Kit vid färgning med klon 4B5 på BenchMark ULTRA-instrument. Ett enda färgningslaboratorie och tre avläsningsplatser i USA deltog i detektionsjämförelsestudien. För klon 4B5-antikropps-färgning på BenchMark ULTRA-instrumentet var PPA-förhållandet mellan resultat erhållna med metoderna iVIEW DAB Detection Kit och **ultraView** Universal DAB Detection Kit baserat på klinisk bedömning (positiv, negativ) 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) och 96.5 % (55/57) för Läsare A, B respektive C och NPA-förhållandet mellan detektionsmetoder var 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) och 97.5 % (77/79) för Läsare A, B respektive C. OPA-värdena mellan detektionskit var 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) respektive 97.1 % (132/136) för läsare A, B respektive C. 3x3-presentationen av överensstämmelsegrader för detektionsjämförelse för varje läsare baserat på kliniskt värde (0/1+, 2+, 3+) visas i tabellerna nedan

Tab. 27. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare A iVIEW DAB Detection Kit jämfört med **ultraView** Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrument.

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Läsare A	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Summa	46	25	65	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 119/136 (87.5) (80.9–92.0) (%) (95 % CI)				

Tab. 28. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare B iVIEW DAB Detection Kit jämfört med **ultraView** Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrument.

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Läsare B	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Summa	33	32	71	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 128/136 (94.1) (88.8–97.0) (%) (95 % CI)				

Tab. 29. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare C iVIEW DAB Detection Kit jämfört med *ultraView* Universal DAB Detection Kit – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrumentet.

iVIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Läsare C	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Summa	32	25	79	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 132/136 (97.1) (92.7–98.9) (%) (95 % CI)				

Reproducerbarhet av prover från detektionsjämförelsestudie mellan patologer:

Positiva och negativa överensstämmelsegrader med dubbelsidigt 95 % värdekonfidensintervall beräknades för de sex möjliga parvisa jämförelserna mellan läsarna för varje metod.

För iVIEW DAB Detection Kit var PPA-förhållandena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A, och C mot B 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) respektive 79.7 % (55/69). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) respektive 97.0 % (65/67). Övergripande överensstämmelsegrad var högst mellan Läsare A och Läsare B (96.3 %) och lägre mellan Läsare A och Läsare C (86.0 %) och Läsare B och Läsare C (88.2 %).

För *ultraView* Universal DAB Detection Kit var PPA-förhållandena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A, och C mot B 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71), respektive 86.2 % (56/65). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) respektive 98.6 % (70/71). Övergripande överensstämmelsegrad var liknande för respektive läsarpär, 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136), och 92.6 % (126/136) för Läsare A mot B, Läsare A mot C respektive Läsare B mot C.

Analytisk prestanda i gastriska fall

Precisionsstudier för BenchMark ULTRA- och BenchMark XT-instrumentet:

Repetierbarhet mellan körningar på BenchMark XT-instrumentet utfördes under fem körningar under en period på 5 spridda dagar. Fem objektglas med tre fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ för HER2-uttryck uppvisade 100 % överensstämmelse inom det positiva/negativa värdet för varje vävnad.

Repetierbarhet inom körning på BenchMark XT-instrumentet utfördes på 28 objektglas med tre fall av gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck. Alla fall poängsattes likvärdigt inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet inom plattform undersöktes på tre BenchMark XT-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 30 objektglas från var och en av två olika multivävnadsblock med tre fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet mellan plattformar testades på tre BenchMark ULTRA-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 15 objektglas från ett multivävnadsblock lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet mellan plattformar testades på tre BenchMark XT- och tre BenchMark ULTRA-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 30 objektglas från ett multivävnadsblock lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Jämförelse av iVIEW DAB Detection Kit och *ultraView* Universal DAB Detection Kit med gastriska fall

Klon 4B5 användes för att utföra tester på detektionskit på två instrument (BenchMark XT-instrument och BenchMark ULTRA-instrument), med iVIEW DAB Detection Kit och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Tvåhundra vävnadsfall användes som en del av precisionstestningen. De färgade objektglasen utvärderades med avseende på positivt/negativt kliniskt värde.

Acceptabilitet för morfologi och bakgrund var 100 % för både detektionskit och instrument. Direkta jämförelser av positiva och negativa kliniska bedömningar av detektionskiten för varje instrument presenteras i följande tabeller.

Tab. 30. Klinisk bedömning av *ultraView* Universal DAB Detection Kit jämfört med iVIEW DAB Detection Kit på BenchMark XT-instrumentet.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	iVIEW DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	21	0	21
Negativt	0	189	189
Summa	21	189	210
	n/N	%(95 % CI)	
Positiv överensstämmelse i procent	21/21	100 (84.5–100)	
Negativ överensstämmelse i procent	189/189	100 (98.0–100)	
Övergripande överensstämmelse i procent	210/210	100 (98.2–100)	

Tab. 31. Jämförelse av klinisk bedömning på BenchMark XT- och BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT-instrument med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA-instrument med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	20	1	21
Negativt	0	189	189
Summa	20	190	210
	n/N	%(95 % CI)	
Positiv överensstämmelse i procent	20/20	100 (83.9–100)	
Negativ överensstämmelse i procent	189/190	99.5 (97.1–99.9)	
Övergripande överensstämmelse i procent	209/210	99.5 (97.4–99.9)	

Reproducerbarhet mellan laboratorier för klon 4B5 vid gastriskt karcinom:

Studien utfördes på tre testplatser. Prover samlades in till studien baserat på klon 4B5 klinisk IHC-poäng, så att det fanns ungefär lika många positiva (3+) och negativa (0, 1+) fall. Dessutom studerades upp till fyra fall av 2+-kvalificerade fall av gastrisk cancer.

De tre platserna använde ett BenchMark XT-instrument och ett BenchMark ULTRA-instrument för att utföra fyra färgningskörningar per instrument. Fallen randomiserades för färgning med en stratifierad randomiseringsprocedur som tilldelade fall så att varje körning innehöll fall som motsvarade alla värdekategorier för HER2 vid gastrisk cancer.

Körningarna på varje instrument på varje plats innehöll samma fall. På varje plats färgades ett objektglas från varje fall med klon 4B5 och ett annat objektglas från samma fall färgades med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig på BenchMark ULTRA-instrumentet. Ett andra par objektglas från samma fall färgades på samma sätt på BenchMark XT-instrumentet på varje plats. Fallens objektglas poängsattes av en kvalificerad läsare på varje plats som var blindad med avseende på tidigare fastställt klinisk IHC-poäng för varje prov.

Övergripande överensstämmelse för alla utvärderingsbara fall var 100 % för alla tre jämförelser mellan platser på både BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark XT-instrumentet. Övergripande överensstämmelse mellan BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark XT-instrumentet för utvärderingsbara fall var 100 % på var och en av de tre platserna. Acceptabilitet för morfologi och bakgrund för alla fall var 100 % för båda instrumenten på Plats A och C och > 95 % för båda instrumenten på Plats B. Se tabeller nedan.

Tab. 32. Övergripande överensstämmelse av klinisk bedömning mellan platser: gastriskt karcinom, alla utvärderingsbara fall.

BenchMark ULTRA-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent (positiva och negativa fall)	Övergripande överensstämmelse i procent (inklusive tvetydiga fall)
Plats A mot Plats B: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	38/42 (90.5 %) (77.9–96.2)
Plats A mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	35/42 (83.3 %) (69.4–91.7)
Plats B mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)	31/42 (73.8 %) (58.9–84.7)
BenchMark XT-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent (positiva och negativa fall)	Övergripande överensstämmelse i procent (inklusive tvetydiga fall)
Plats A mot Plats B: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0–91.9)
Plats A mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0–91.9)
Plats B mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)	35/43 (81.4 %) (67.4–90.3)

Tab. 33. Övergripande överensstämmelse av klinisk bedömning mellan plattformar: gastriskt karcinom alla utvärderingsbara fall.

BenchMark ULTRA-instrument mot BenchMark XT-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent (positiva och negativa fall)	Övergripande överensstämmelse i procent (inklusive tvetydiga fall)
Plats A: n/N (%) (95 % CI)	40/40 (100 %) (91.2–100)	42/44 (95.5 %) (84.9–98.7)
Plats B: n/N (%) (95 % CI)	34/34 (100 %) (89.8–100)	37/42 (88.1 %) (75.0–94.8)
Plats C: n/N (%) (95 % CI)	32/32 (100 %) (89.3–100)	38/44 (86.4 %) (73.3–93.6)

Tab. 34. Bakgrundsacceptans och acceptabilitet för morfologi: gastriskt karcinom, alla fall.

BenchMark ULTRA-instrument	Plats A	Plats B	Plats C
Acceptabilitet för morfologi	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Bakgrundsacceptans	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
BenchMark XT-instrument	Plats A	Plats B	Plats C
Acceptabilitet för morfologi	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Bakgrundsacceptans	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

Jämförelsestudie av BenchMark-instrument och BenchMark GX-instrument med BenchMark XT-instrument: Gastriskt karcinom

Snitt på objektglas med 3 TMAer som innehöll FFPE-fall av gastriskt karcinom [cirka 50 fall per TMA] färgades på ett BenchMark XT-instrument, BenchMark-instrument och BenchMark GX-instrument med respektive rekommenderade färgningsprotokoll för *ultraView* Universal DAB Detection Kit och *iVIEW* DAB detektionskit. Kontrollerna

innefattade PATHWAY HER-2 4 i 1 Control Slides och ett andra objektglas av varje TMA färgat med negativ Ig-reagens. De färgade objektglasen bedömdes av en läsare (patolog).

Övergripande överensstämmelsegrad (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var enligt följande: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.0 % (94.2–99.3), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97.4 % (93.6–99.0), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 96.6 % (92.7–98.4), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 95.9 % (91.8–98.0).

Positiv överensstämmelsegrad (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var enligt följande: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91.7 % (64.4–98.5), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78.6 % (52.4–92.4), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 80.0 % (54.8–93.0), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 73.3 % (48.0–89.1).

Negativ överensstämmelsegrad (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var enligt följande: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8–99.6), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1–99.9), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.6–99.4), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *iVIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.5–99.3). 2x2-presentationen av överensstämmelsegrader för varje jämförelse baserat på kliniskt värde (positiva, negativa) visas i tabellerna nedan.

Tab. 35. BenchMark-instrument kontra BenchMark XT-instrument överensstämmelsegrader mellan plattformar med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 2x2 analys: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	11	2	13
Negativt	1	133	134
Summa	12	135	147
	n/N	% (95 % KI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	144/147	98.0 % (94.2–99.3)	
Positiv överensstämmelse i procent	11/12	91.7 % (64.6–98.5)	
Negativ överensstämmelse i procent	133/135	98.5 % (94.8–99.6)	

Tab. 36. 2x2-analys av överensstämmelsegrad mellan plattformar för BenchMark GX-instrument kontra BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	11	1	12
Negativt	3	140	143
Summa	14	141	155
	n/N	% (95 % KI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	151/155	97.4 % (93.6–99.0)	

Klon 4B5 med ultraView Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positiv överensstämmelse i procent	11/14	78.6 % (52.4–92.4)	
Negativ överensstämmelse i procent	140/141	99.3 % (96.1–99.9)	

Tab. 37. 2x2-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark-instrument kontra BenchMark XT-instrument med iVIEW DAB detektionskit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med iVIEW DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	12	3	15
Negativt	3	156	159
Summa	15	159	174
	n/N	% (95 % KI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	168/174	96.6 % (92.7–98.4)	
Positiv överensstämmelse i procent	12/15	80.0 % (54.8–93.0)	
Negativ överensstämmelse i procent	156/159	98.1 % (94.6–99.4)	

Tab. 38. 2x2-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark GX-instrument kontra BenchMark XT-instrument med iVIEW DAB detektionskit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med iVIEW DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	11	3	14
Negativt	4	154	158
Summa	15	157	172
	n/N	% (95 % KI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	165/172	95.9 % (91.8–98.0)	
Positiv överensstämmelse i procent	11/15	73.3 % (48.0–89.1)	
Negativ överensstämmelse i procent	154/157	98.1 % (94.5–99.3)	

KLINISK PRESTANDA

HER2-låg bröstcancer

Klinisk utfallsstudie – DESTINY-BREAST04

DESTINY-BREAST04 var en fas III multicenter, randomiserad, open-label, aktivt styrd studie för att utvärdera säkerheten och effektiviteten för trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) hos patienter med icke-resektabel och/eller metastatisk bröstcancer som uttryckte låga nivåer av HER2.

För att kvalificera för inkludering i studien behövde tumörer uppvisa låga nivåer av HER2-uttryck fastställt med IHC with the anti-HER2 (4B5)-antikropp.

En tumör med en HER2 IHC-poäng på 1+ ansågs indikera en HER2-låg status. En tumör ansågs även HER2-låg om HER2 IHC-poängen var 2+ och reflextestning med INFORM HER2 Dual ISH-analys indikerade frånvaro av HER2-genamplifiering (ISH-). Registrerade

patienter randomiserades 2:1 för behandling med trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) eller med läkarens val av kemoterapeutisk behandling. Den centralt erhållna HER2-låg poängen (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH-) var en av tre stratifieringsfaktorer som användes randomisering av patienter i den studien.

Effektivitetsanalyser utfördes för den fullständiga analysuppsättningen och den hormonreceptorpositiva populationen (positiv för östrogenreceptor och/eller progesteronreceptor).

I den primära analysen gjordes en bedömning av progressionsfri överlevnad (PFS) baserad på blindad oberoende central granskning (BICR) i den hormonreceptorpositiva delmängden med stratifiering baserat på centralt bedömd HER2-låg status/poäng (IHC 1+ eller IHC 2+/ISH-), antal tidigare linjer av kemoterapi (1 eller 2) samt tidigare behandling med cyklinberoende (CDK)4/6-hämmare (ja eller nej). Behandling med trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) associerades med statistiskt signifikant och kliniskt meningsfull ökning av PFS samt total överlevnad (OS) i den här populationen jämfört med läkarens val av behandling.

Tab. 39. PFS och OS per BIRC i den hormonreceptorpositiva populationen och fullständiga analysuppsättningen (DESTINY-BREAST04)

Parameter	Hormonreceptorpositiv population		Fullständig analysuppsättning	
	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Läkarens val av behandling N = 163	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Läkarens val av behandling 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)
Risikförhållande b (95 % CI)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	
P-värde c	< 0.0001		< 0.0001	
Total överlevnad (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)
Risikförhållande b (95 % CI)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
P-värde c	0.0028		0.0010	

CI = konfidensintervall, PFS = progressionsfri överlevnad, OS = övergripande överlevnad

a Median PFS och OS är uppskattningar från Kaplan-Meier-analys. Tvåsidiga 95 CI:er för median PFS och OS beräknades med Brookmeyer-Crowley-metoden.

b Baserat på stratifierad proportionerlig Cox-riskmodell. Stratifieringsfaktorer HER2-låg poäng, antal tidigare linjer med kemoterapi och antingen behandling med cyklinberoende kinas 4/6-hämmare (för fullständig analysuppsättning och hormonreceptorpositiv) eller hormonreceptor-/cyklinberoende kinasstatus (för fullständig analysuppsättning).

c Tvåsidigt P-värde från stratifierat log-rank test.

HER2-positiv bröstcancer

Jämförelsestudier av klon 4B5 kanin monoklonal antikropp med PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody vid bröstcancer

En metodjämförelsestudie genomfördes för att undersöka korrelationen av klon 4B5 med PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp) och PathVysion HER2 FISH, båda tidigare-godkända diagnostiska tester. Sex utredare deltog i studien. Två oberoende kohorter med prover av invasiv bröstcancer användes i studien: en med 178 prover från Cleveland Clinic Foundation (kohort 1) och en med 144 prover som samlats in av IMPATH Predictive Oncology från flera internationella platser (kohort 2). Två uppsättningar med tre olika utredare utvärderade de två oberoende kohorterna (kohort 1: n = 178, kohort 2: n = 144) med kända bröstcancerfall färgade med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp och klon 4B5. FISH-data erhöles från patienthistoriken. Ett konsensusvärde från de tre läsarna för varje

antikropp skapades för varje fall för att minska variation inom läsare som man känner till med HER2-bedömning.^{42,43,44} Totalt 322 fall bedömdes. Objektglasen färgade med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp bearbetades och färgades enligt tillverkarens instruktioner som anges i metodbladet för PATHWAY HER2 (CB11)-antikropp. Det var i genomsnitt ungefär ett år mellan färgning och läsning av PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropsfärgade objektglas. Kliniskt signifikanta resultat (positiva/negativa) från HER2 (4B5) IHC-analysen och PATHWAY anti-HER2 (CB11) IHC-analysen i de två kohorterna visas nedan:

Tab. 40. Kliniskt signifikanta poäng: IHC-analys för kohort 1

HER2 (4B5)-antikropp	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	86	5	91
Negativt	7	80	87
Summa	93	85	178
	n/N	% (95 % konfidensintervall)	
Positiv överensstämmelse i procent	86/93	92.5 (85.2–96.9)	
Negativ överensstämmelse i procent	80/85	94.1 (86.8–98.1)	
Övergripande överensstämmelse i procent	166/178	93.3 (88.5–96.4)	
Kliniskt signifikanta-resultaten ansågs IHC-positiva (2+ och 3+) samt -negativa (0+ och 1+)			

Tab. 41. Kliniskt signifikanta poäng: IHC-analys för kohort 2

HER2 (4B5)-antikropp	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp		
	Positiva	Negativa	Totalt
Positivt	69	22	91
Negativt	0	53	53
Summa	69	75	144
	n/N	% (95 % konfidensintervall)	
Positiv överensstämmelse i procent	69/69	100 (97.5–100)	
Negativ överensstämmelse i procent	53/75	70.6 (58.5–80.1)	
Övergripande överensstämmelse i procent	122/144	84.7 (78.2–90.0)	
Kliniskt signifikanta-resultaten ansågs IHC-positiva (2+ och 3+) samt -negativa (0+ och 1+)			

De IHC-baserade resultaten från HER2 (4B5) IHC-analysen jämfördes också mot resultat från PathVysion HER2 FISH-analysen. IHC-positiva resultat motsvarar fall med en IHC-poäng på 2+ eller 3+ och FISH-positiva resultat motsvarar fall som uppvisade amplifiering av HER2-genen. Överensstämmelsedata för klon 4B5 IHC-analysen jämfört med FISH-resultat i de två kohorterna visas nedan:

Tab. 42. Kliniskt signifikant överensstämmelse: IHC till FISH för kohort 1

HER2 (4B5)-antikropp	n/N	% (95 % konfidensintervall)
Positiv överensstämmelse i procent	83/93	89.2 (82.5–95.1)
Negativ överensstämmelse i procent	77/85	90.6 (84.0–96.4)
Övergripande överensstämmelse i procent	160/178	90.0 (85.4–93.6)

Tab. 43. Kliniskt signifikant överensstämmelse: IHC till FISH för kohort 2

HER2 (4B5)-antikropp	n/N	% (95 % konfidensintervall)
Positiv överensstämmelse i procent	80/86	93.0 (87.9–96.3)
Negativ överensstämmelse i procent	47/58	81.0 (73.4–86.0)
Övergripande överensstämmelse i procent	127/144	88.2 (82.1–92.2)

Slutsats: Denna studie visade att det finns en signifikant överensstämmelse (övergripande överensstämmelse mellan positiva/negativa resultat) mellan klon 4B5-analysen och PATHWAY anti-HER2 (CB11)-analysen, vilket därmed visar att VENTANA HER2 (4B5) Assay är ett acceptabelt alternativ till PATHWAY anti-HER2 (CB11)-analysen för att använda vid bedömning av bröstcancerpatienter för vilka behandling med trastuzumab (Herceptin) övervägs. Studien visade även att resultat för HER2-uttryck som erhållits från klon 4B5 IHC-analys är jämförbara med resultat för HER2-genstatus som fastställts med FISH-analys.

Jämförelse med registreringsanalys för studierna PERJETA (pertuzumab) och KADCYLA (trastuzumab emtansin) vid bröstcancer

Överensstämmelse med registreringsmetoder för kohorter från studierna PERJETA och KADCYLA fastställdes genom färgning av studieprover med VENTANA HER2 (4B5) Assay. Totalt 2753 prover som utvärderades för PERJETA-prövningen och 99 prover som utvärderades för KADCYLA-prövningen färgades med VENTANA HER2 (4B5) Assay. Överensstämmelsegrader (PPA, NPA och OPA) fastställdes. 95 % CI (2-sidigt 95 % konfidensintervall) beräknades med score-metoden.

Tab. 44. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analys för vad gäller HER2-status för alla HER2-utvärderingsbara objekt. IHC-utvärderingsbara deltagare har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

Studie	Klon 4B5-värde ^b	Dako HER2-status ^{a,b}		
		Positiva	Negativa	Totalt
PERJETA och KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Summa	2558	272	2830
	Positiv överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2380/2558 (93.0) (92.0–94.0)		
	Negativ överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	257/272 (94.5) (91.1–96.6)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2637/2830 (93.2) (92.2–94.1)		

^a Positiv = IHC-positiv och/eller ISH-amplifierad. Negativ = IHC-negativ och ej ISH-amplifierad eller ISH-icke-amplifierad och ej IHC-positiv.

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

Tab. 45. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analyser med avseende på IHC-status för alla IHC-utvärderingsbara deltagare. IHC-utvärderingsbara deltagare har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både Klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

		Dako HercepTest-status ^a		
Studie	Klon 4B5-status ^a	Positiva	Negativa	Totalt
PERJETA och KADCYLA	Positivt	2330	65	2395
	Negativt	21	414	435
	Summa	2351	479	2830
	Positiv överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2330/2351 (99.1) (98.6–99.4)		
	Negativ överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	414/479 (86.4) (83.1–89.2)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2744/2830 (97.0) (96.3–97.5)		
PERJETA	Positivt	2267	63	2330
	Negativt	10	399	409
	Summa	2277	462	2739
	Positiv överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2267/2277 (99.6) (99.2–99.8)		
	Negativ överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	399/462 (86.4) (82.9–89.2)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	2666/2739 (97.3) (96.7–97.9)		
KADCYLA	Positivt	63	2	65
	Negativt	11	15	26
	Summa	74	17	91
	Positiv överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	63/74 (85.1) (75.3–91.5)		
	Negativ överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	15/17 (88.2) (65.7–96.7)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N, %, (95 % CI)	78/91 (85.7) (77.1–91.5)		

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

Tab. 46. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analyser med avseende på IHC-poäng för alla IHC-utvärderingsbara deltagare. IHC-utvärderingsbara deltagare har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både Klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

		Dako HercepTest-värde			
Studie	Klon 4B5-värde	3+	2+	0/1+	Totalt
PERJETA och KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Summa	2351	325	154	2830
	Övergripande överensstämmelse i procent 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
	Summa	2277	312	150	2739
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2629/2739 (96.0) (95.2–96.7)			
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Summa	74	13	4	91
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	74/91 (81.3) (72.1–88.0)			

Tab. 47. Färgningsacceptans för Klon 4B5. IHC-testade deltagare. IHC-färgning anses acceptabel om ett giltigt IHC-värde (0, 1+, 2+ eller 3+) kunde fastställas. Orsaker till ej acceptabel färgning omfattar oacceptabel negativ kontroll, förlust av vävnad, otillräcklig tumör, oacceptabel bakgrund och oacceptabel morfologi.

Parameter	PERJETA	KADCYLA	PERJETA och KADCYLA
Antal initiala IHC-tester	2753	99	2852
Initial färgningsacceptans 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 upprepade IHC-tester	40	0	40
Slutlig färgningsacceptans 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)

Klinisk utfallsstudie – KATHERINE

Prestandan för HER2-klon 4B5 och INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (INFORM HER2 Dual ISH metoden) undersöktes i KATHERINE (BO27938), en randomiserad, multicenter, open label, fas III-studie för att utvärdera effektiviteten och säkerheten för trastuzumab emtansin (KADCYLA) kontra trastuzumab (Herceptin) som adjuvant behandling för patienter med HER2-positiv primär bröstcancer som har kvarvarande patologisk förekomst av tumör i bröst eller axillära lymfkörtlar efter preoperativ behandling (NCT01772472).

Patientprover färgades med klon 4B5 och/eller INFORM HER2 Dual ISH och bedömdes med avseende på färgningsacceptans och HER2-status. Sammanfattningsvis var de flesta exemplar biopsi före behandling (80.9 %), samlat främst som biopsi (75.3 %) eller via kirurgiska metoder (24.3 %). Fler prover visade duktal neoplastisk subtyp (95.4 %), och de flesta erhöles inte från ett metastatiskt prov (96.2 %).

I KATHERINE registrerades 1486 patienter med HER2-positiv, tidig bröstcancer med invasiv residualtumör i bröstet och/eller axillära lymfkörtlar efter taxan- och trastuzumab-baserad behandling som en del av en neoadjuvant regim före studien. Patienter fick strålningsbehandling och/eller hormonell behandling samtidigt med studiebehandlingen i enlighet med lokala riktlinjer. Brösttumörprover behövde uppvisa HER2-överuttryck definierat som 3+ IHC eller ISH-amplifieringsförhållande ≥ 2.0 fastställt vid ett centralt laboratorium. Patienterna randomiserades (1:1) för att få trastuzumab eller KADCYLA. Randomisering stratifierades efter kliniskt stadium vid presentation, hormonreceptorstatus, preoperativ HER2-riktad terapi (trastuzumab, trastuzumab plus ytterligare HER2-riktad(e) agent(er)) och patologisk nodstatus utvärderad efter preoperativ behandling.

Den primära effekt-endpointen för KATHERINE-studien var invasiv sjukdomsfri överlevnad (IDFS). IDFS definierades som tiden från datumet för randomisering till första förekomst av ipsilaterala invasiva brösttumöråterfall, ipsilaterala lokala eller regionala invasiva bröstcanceråterfall, avlägsna återfall, kontralateral invasiv bröstcancer eller död av någon orsak.

En kliniskt meningsfull och statistiskt signifikant förbättring av IDFS observerades hos patienter vars bröstcancerprover identifierats som HER2-positiva med klon 4B5 IHC-analysen, som fick trastuzumab emtansin (KADCYLA) jämfört med trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, 95 % CI [0.32, 0.58]), vilket motsvarar 57 % minskning av risken för en IDFS-händelse. Effektivitetsresultat för den IHC-positiva undergruppen presenteras i Tab. 48.

Dataanalys visar också att med eller utan justering för differentiell provtagning i studiepopulationen på grund av lokal förhandsgranskning av test, är bedömningarna av läkemedelseffektivitet likartade.

Tab. 48. Effektivitetsresultat från KATHERINE för den IHC-positiva undergruppen.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
Primär slutpunkt	Invasiv sjukdomsfri överlevnad (IDFS) ^a	
Antal (%) patienter med händelse	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [95 % CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
3 års händelsefri andel % ^b	89.0	75.7

^a Data från första interimanalysen

^b Andel med 3 år utan händelse inhämtad från Kaplan-Meier-uppskattningar

Data från KATHERINE-studien visar att adjuvant trastuzumab emtansin (KADCYLA) visade en klar behandlingsfördel jämfört med adjuvant trastuzumab (Herceptin) hos patienter med HER2-positiv tidig bröstcancer med kvarvarande sjukdom efter avslutad neoadjuvant behandling. HER2 klon 4B5 och INFORM HER2 Dual ISH-analysen är användbara för att identifiera de patienter som sannolikt kommer att dra nytta av behandling med trastuzumab-emtansin (KADCYLA).

Magcancer

Jämförelse av klon 4B5 och HercepTest vid human magcancer

En blindad, extern studie utfördes för att jämföra färgningsprestandan hos klon 4B5 på BenchMark XT-instrumentet med prestandan hos Dako HercepTest. Två kohorter med prover studerades, (1) nyligen konstruerade vävnadsmikroarrayer (TMA) som innehöll 248 fall av magcancer (sex fall konstaterades senare vara duplikat och avlägsnades), och (2) en delmängd av 183 kliniska testprover från prövningen Trastuzumab för Gastric

Cancer (ToGA) Trial som undersökte HER2-status och kliniskt resultat hos patienter som behandlades med Herceptin (trastuzumab). Laboratoriet färgade fallen med klon 4B5 och HercepTest. Totalt 431 fall färgades med bägge analyser och (efter att duplicerade fall tagits bort) inkluderades 398 unika fall i jämförelsen. En patolog värderade fallen enligt skalan 0/1+, 2+ och 3+. Positiva fall har värdena 2+ och 3+, medan negativa fall har värdena 0 och 1+. Överensstämmelsegraden mellan klon 4B5 och HercepTest för bägge kohorter som studerades finns i tabellen nedan.

Tab. 49. Överensstämmelsedata för klon 4B5 (IHC) jämfört med HercepTest vid gastriskt karcinom.

Vävnadskälla	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % CI)	Positiv överensstämmelse i procent (95 % CI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % CI)
TMA ^a och 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-resultaten ansågs som antikroppspositiva (2+ och 3+) och -negativa (0+ och 1+).

^a TMA: vävnadsprover i mikroarray

^b ToGA: kliniska testprover från ToGA-prövningen

FELSÖKNING

- Om den positiva kontrollen uppvisar svagare färgning än väntat, ska andra positiva kontroller som körts i samma instrumentkörning, kontrolleras för att avgöra om det beror på primärantikroppen eller en av de vanliga sekundära reagenserna.
- Kontrollera att objektglaset har rätt streckkodsetikett om den positiva kontrollen är negativ. Om objektglaset är märkt ordentligt, ska andra positiva kontroller som körts i samma instrumentkörning kontrolleras för att avgöra om det beror på primärantikroppen eller en av de vanliga sekundära reagenserna. Vävnader kan ha samlats in på fel sätt, fixerats eller avparaffinerats. Rätt procedur för insamling, lagring och fixering ska följas.
- Om allt paraffin inte har tagits bort kanske det inte finns någon färgning. Avparaffineringen ska upprepas.
- Om vävnadssnitt sköljs av objektglaset, bör objektglaset kontrolleras för att säkerställa att de är positivt laddade.
- Om nukleär och cytoplasmisk färgning förekommer i normal slemhinna i närheten av tumörområdet vid gastriskt karcinom och försvårar tolkningen av membranfärgning kan fallet testas med ISH.
- Mer information om korrigering åtgärder hittar du i avsnittet Färgningsprocedur i instrumentets användarhandbok eller genom att kontakta din lokala supportrepresentant.

REFERENSER

- 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.
- 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.
- Schrohl 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.
- 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.
- Moasser MM. The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
- 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.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
- Tarantino P, Hamilton E, Tolaney 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 Emtrastine 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. Nadji 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, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

OBS! En punkt används i detta dokument alltid som decimalavskiljare för att markera gränsen mellan integralen och bråkdelarna i ett decimaltal. Tusentalsavgränsare används inte.

Sammanfattning av säkerhet och prestanda finns här:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symboler

Ventana använder följande symboler och tecken utöver de som anges i standarden ISO 15223-1 (för USA: se elabdoc.roche.com/symbols för ytterligare information).



GS1-artikelnnummer

Rx only

För USA: Var försiktig: Federal lag begränsar denna enhet till försäljning av eller på ordination av läkare.

VERSIONSHISTORIK

Rev	Uppdateringar
C	Uppdateringar av avsnittet Färgningsprocedur och Poängsättningskonventioner för gastriskt karcinom i tabell 7. Korrigeringar av terminologi och interpunktion. Lagt till BenchMark ULTRA PLUS-instrument.

IMMATERIALRÄTT

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY och ULTRAVIEW är varumärken som tillhör Roche. Alla andra produktnamn och varumärken tillhör sina respektive ägare.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTUPPGIFTER



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

www.roche.com

