VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493

05999570001

IVD Σ 50

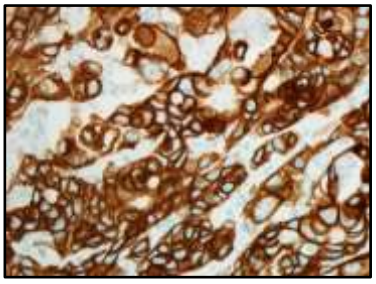

Abb. 1. 3+-Färbung eines Magenkarzinoms mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper.

VERWENDUNGSZWECK

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody ist für den semiquantitativen Nachweis von HER2-Antigen in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem normalem und neoplastischem Brust- und Magengewebe bestimmt, die auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät gefärbt wurden.

Dieses Produkt ist zur Unterstützung der Beurteilung von Brust- und Magenkrebspatienten, für die eine Behandlung mit Herceptin® (Trastuzumab) in Betracht gezogen wird, und für Patienten mit Mammakarzinom, für die eine Behandlung mit KADCYLA® (Ado-Trastuzumab-Emtansin) oder PERJETA® (Pertuzumab) in Betracht gezogen wird, indiziert.

Dieses Produkt muss von einem qualifizierten Pathologen in Verbindung mit histologischen Untersuchungen, klinisch relevanten Daten und geeigneten Kontrollen interpretiert werden.

Dieser Antikörper ist für die Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD) bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper) ist ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper (Klon 4B5), der gegen die interne Domäne des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) gerichtet ist. HER2 wurde von Akiyama et al 1986 kloniert und beschrieben.[1] Es wurde gezeigt, dass Klon 4B5 im Western Blot mit einem 185-kD-Protein aus Lysaten von SK-BR-3-Zellen reagiert. SK-BR-3 ist eine Mammakarzinom-Zelllinie mit 128-facher Überexpression von HER2 mRNA.[2] Die Größe der identifizierten Bande korreliert gut mit der von Akiyama et al. für das HER2-Protein angegebenen (185 kD).[1] Immunhistochemische (IHC) Untersuchungen mit transfizierten Zelllinien (HEK293) ergaben, dass der Klon 4B5 mit HER2 transfizierte Zellen und mit HER4 transfizierte Zellen färbt. Es wurde keine Färbung von mit HER1 oder HER3 transfizierten Zellen festgestellt. Auch Western-Blot-Daten mit rekombinantem HER4-Protein ergaben, dass der Klon 4B5 ein HER4-Epitop erkennt.

HER2 ist eine Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinase mit ungefähr 185 kD, die eine ähnliche Struktur wie der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) aufweist.[3,4] Bei verschiedenen Tumoren, auch bei Mammakarzinomen und Magenkrebs, liegt eine Genamplifikation und eine entsprechende Überexpression von HER2 vor.[3,4,5] Eine Proteinüberexpression aufgrund einer Amplifikation des *HER2*-Gens ist der Hauptfaktor bei einer HER2-vermittelten Tumorentstehung.[3] Eine zu starke Expression von HER2-Protein an der Zellmembran führt zu einer verstärkten Signalübertragung. Dadurch wiederum werden die Proliferation und die Differenzierung hochreguliert, was letztendlich zur Tumorbildung führt.[3,4,5]

Zwischen 15 und 30 % der invasiven duktalen Karzinome sind positiv für Überexpression und/oder Amplifikation des Gens für das HER2-Protein.[6,7] Fast alle Fälle von Paget-Krankheit der Brust und bis zu 90 % der Fälle eines duktalen Carcinoma in situ vom Komedo-Typ sind positiv.[6,8] Eine Überexpression und/oder Amplifikation des Gens für das HER2-Protein tritt bei Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Überganges auf.[9,10,11] In veröffentlichten Studien wurde über ein breites Spektrum der Häufigkeit einer HER2-Überexpression berichtet. Aus einem der größten Screening-Datensätze, der 3803 Patienten mit Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Überganges umfasste, geht jedoch hervor, dass 22 % der Patienten positiv auf Überexpression und/oder Amplifikation des Gens für das HER2-Protein getestet wurden.[12]

KLINISCHE BEDEUTUNG

Das Mammakarzinom bzw. Brustkrebs ist bei Frauen das am häufigsten auftretende Karzinom und die zweithäufigste Todesursache im Zusammenhang mit Krebs.[4,6] In Nordamerika beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Frau an Brustkrebs erkrankt, 12.5 %.[4] Früherkennung und geeignete Therapien können das Gesamtüberleben erheblich verlängern.[13,14] Immunhistochemische Routineuntersuchungen lassen sich vor allem mit kleinen Gewebeproben ohne Weiteres durchführen, sodass diese Technik in Kombination mit Antikörpern zum Nachweis von Antigenen, die für die Karzinominterpretation wichtig sind, ein effektives Hilfsmittel des Pathologen bei der Diagnose und Prognose des Tumors darstellt. Das Onkoprotein HER2 gilt heute als wichtiger Brustkrebsmarker.[15-18] Die Therapeutika Herceptin (Trastuzumab), PERJETA (Pertuzumab) und KADCYLA (Ado-Trastuzumab-Emtansin/Trastuzumab-Emtansin) haben bei manchen Patienten mit Mammakarzinom günstige Wirkung, indem sie das Wachstum des Tumors zum Stillstand bringen und den Tumor mitunter sogar zum Schrumpfen bringen.[15-19] Bei den Arzneimitteln handelt es sich um humanisierte monoklonale Antikörper, die an das HER2-Protein auf Krebszellen binden.[7,15,18,19] In-vitro-Diagnostika zur Beurteilung des HER2-Status bei Patienten mit Mammakarzinom sind wichtig, um dem Arzt die Festlegung einer auf HER2 abzielenden Therapie zu erleichtern.[15-18] Der IHC-basierte Nachweis der HER2-Proteinexpression wird als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Patienten mit Mammakarzinom verwendet, bei denen eine auf HER2 abzielende Behandlungen mit Herceptin (Trastuzumab), PERJETA (Pertuzumab) oder KADCYLA (Trastuzumab-Emtansin) in Erwägung gezogen wird.

Magenkrebs ist die fünfthäufigste Krebsart und eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen weltweit.[10] Er wird meist chirurgisch behandelt.[11,20] Die meisten Fälle von Magenkrebs werden jedoch erst in einem fortgeschrittenen Stadium nachgewiesen, in dem eine Operation häufig schwierig durchzuführen ist.[11,20] Zur Behandlung von fortgeschrittenem Magenkrebs werden Chemotherapien eingesetzt, wenngleich die Überlebensrate der Krebspatienten sehr gering ist. [11,20] Die auf HER2 abzielende Therapie mit Trastuzumab ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Behandlung eines invasiven Mammakarzinoms und auch bei der Behandlung von Magenkrebspatienten mit Überexpression des Rezeptors von therapeutischem Wert.[9,11] Der Nachweis einer Amplifikation und/oder Überexpression des Gens für das *HER2*-Protein ist für die Auswahl der Patienten für eine Therapie mit Trastuzumab unerlässlich.[9,11] Klinische Studien zeigten, dass Patienten mit Mammakarzinom oder Magenkrebs mit hoher Überexpression und/oder Amplifikation des Gens für das HER2-Protein am meisten von Trastuzumab profitieren.[9] Der IHC-basierte Nachweis der Expression von HER2-Protein wird als Hilfsmittel bei der Beurteilung von Magenkrebspatienten herangezogen, bei denen eine Behandlung mit Herceptin (Trastuzumab) in Betracht gezogen wird.

Bei der Interpretation der Ergebnisse eines jeden Nachweissystems für HER2 muss berücksichtigt werden, dass HER2 sowohl in gesundem Gewebe als auch in karzinösem Tumorgewebe in der Brust und im Magen exprimiert wird, wenn auch unterschiedlich stark und mit unterschiedlichen Expressionsmustern.[10,21] Histologische Gewebepräparate haben den Vorteil einer intakten Gewebemorphologie, was die Interpretation der HER2-Expression der Probe erleichtert.

VERFAHRENSPRINZIP

Bei dem VENTANA anti-HER2-Antikörper (4B5) handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe an HER2 bindet. Der spezifische Antikörper kann entweder durch eine Formulierung mit einem biotinkonjugierten sekundären Antikörper, der Kaninchen-Immunglobuline erkennt, gefolgt von der Zugabe eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugats (*i*VIEW DAB Detection Kit), oder mit einem Konjugat aus einem sekundären Antikörper und HRP (*ultra*View Universal DAB Detection Kit) lokalisiert werden. Die Sichtbarmachung des spezifischen Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt mithilfe eines Enzymreaktionsproduktes, das einen Niederschlag bildet. Bei jedem Schritt wird der Komplex für einen genau festgelegten Zeitraum und bei einer genau festgelegten Temperatur inkubiert. Am Ende jedes Inkubationsschrittes werden die Schnitte auf dem Gerät gewaschen, um die Reaktion zu stoppen und ungebundenes Material zu entfernen, das andernfalls in den folgenden Schritten den Eintritt der gewünschten Farbreaktion verhindern könnte. Das Gerät trägt auch Liquid Coverslip auf, das die Verdampfung der wässrigen Reagenzien vom Probenobjektträger minimiert.

Klinische Fälle sollten im Kontext der Durchführung angemessener Kontrollen ausgewertet werden. Es empfiehlt sich die Verwendung einer positiven Gewebekontrolle, die auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe fixiert und aufbereitet wird (z. B. Gewebe aus einem schwach positiven Mamma- oder Magenkarzinom). Neben der Färbung mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper sollte ein zweiter Objektträger mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig gefärbt werden. Damit der Test als gültig betrachtet werden kann, sollte das positive Kontrollgewebe eine Membranfärbung der Tumorzellen aufweisen. Diese Bestandteile sollten bei der Färbung mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig negativ sein. Außerdem wird empfohlen, dass bei jeder Charge von Proben, die auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät verarbeitet und analysiert wird, eine negative Gewebekontrolle mitgeführt wird (z. B. Gewebe eines HER2-negativen Mamma- bzw. Magenkarzinoms). Diese negative Gewebekontrolle sollte mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper gefärbt werden, um sicherzustellen, dass die Antigenanreicherung und andere Vorbehandlungsverfahren keine falsch-positive Färbung verursacht haben.

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

Der VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper enthält ausreichendes Reagenzmaterial für 50 Tests.

Ein 5-mL-Spender mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper enthält etwa 30 µg eines monoklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen das humane HER2-Antigen.

Der Antikörper ist in 0.05 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 mit 0.3 % Trägerprotein und 0.05 % Natriumazid, einem Konservierungsmittel, verdünnt. Zudem sind Spuren (etwa 0.25 %) des aus der ursprünglichen Stammlösung stammenden fötalen Kälberserums enthalten.

Die spezifische Antikörperkonzentration beträgt etwa 6 µg/mL. Der VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper ist ein aus Gewebekulturüberständen verdünnter Kaninchenantikörper des Subtyps IgG.

Eine ausführliche Beschreibung der folgenden Punkte ist dem Methodenblatt des entsprechenden VENTANA Nachweiskits zu entnehmen: Verfahrensprinzip, Materialien und Methoden, Probensammlung und -vorbereitung zur Analyse, Qualitätskontrollverfahren, Fehlerbehebung, Interpretation der Ergebnisse und Einschränkungen.

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE, ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Färbereagenzien wie die VENTANA Nachweiskits und Hilfskomponenten, einschließlich der Objektträger mit negativen und positiven Gewebekontrollen, werden nicht mitgeliefert.

Möglicherweise sind nicht alle in dem Methodenblatt aufgeführten Produkte in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienst.

Die folgenden möglicherweise für die Färbung benötigten Reagenzien und Materialien sind nicht im Lieferumfang enthalten:

1. Empfohlenes Kontrollgewebe
2. Objektträger, positiv geladen
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (Art.-Nr. 790-4795 / 06683380001)
4. *ultra*View DAB Detection Kit (Art.-Nr. 760-500 / 05269806001)
5. *i*VIEW DAB Detection Kit (Art.-Nr. 760-091 / 05266157001 (50 Tests))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Art.-Nr. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (Art.-Nr. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (Art.-Nr. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Art.-Nr. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (Art.-Nr. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (Art.-Nr. 760-2037 / 05266769001)
14. Allgemeine Laborgeräte
15. BenchMark IHC/ISH Gerät

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Bei Annahme, und wenn nicht verwendet, bei 2-8 °C lagern. Nicht einfrieren.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität des Antikörpers zu gewährleisten, muss die Spender-Verschlusskappe nach jedem Gebrauch wieder aufgesetzt und der Spender sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank gestellt werden.

Jeder Antikörperspender ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei korrekter Lagerung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Reagenz darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

PROBENVORBEREITUNG

Für diesen primären Antikörper eignet sich routinemäßig präpariertes FFPE-Gewebe, wenn es mit einem VENTANA Nachweiskit und einem BenchMark IHC/ISH Gerät verwendet wird. Als Gewebefixierungsmittel wird 10 % neutral gepuffertes Formalin empfohlen.[22] Objektträger möglichst sofort färben, da die Antigenität der Gewebeschnitte mit der Zeit nachlassen kann.

Es wird empfohlen, unbekannte Proben gleichzeitig mit positiven und negativen Kontrollen zu testen.

Es sollten etwa 4 µm dicke Gewebeschnitte erstellt und auf Glasobjektträger aufgebracht werden. Es sollten Superfrost Plus oder gleichwertige Objektträger verwendet werden. Studien zeigen, dass luftgetrocknete Gewebe- und Zelllinienschnitte, die bei 2–8 °C gelagert werden, bis zu 6 Monate haltbar sind. Jedes Labor sollte die Stabilität von Schnitten auf Objektträgern für die eigenen Verfahren und vorhandenen Lagerbedingungen selbst validieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik (IVD).
2. Nur zur professionellen Verwendung.
3. **WICHTIGER HINWEIS:** In den USA ist der Verkauf dieses Produkts laut Bundesgesetz nur durch einen Arzt oder auf Anordnung eines Arztes zulässig. (Rx Only (verschreibungspflichtig))
4. Nur für die angegebene Testanzahl verwenden.
5. Positiv geladene Objektträger können gegenüber umgebungsbedingten Belastungen anfällig sein, die zu einer nicht adäquaten Färbung führen. Mehr Informationen über die Verwendung dieser Arten von Objektträgern erhalten Sie von Ihrem Roche Servicetechniker.
6. Möglicherweise steht dieses Produkt nicht in allen Ländern zur Auswahl von Patienten zur Verfügung, die für eine Behandlung mit KADCYLA oder PERJETA geeignet sind. Bitte wenden Sie sich an Ihren Roche-Vertreter vor Ort, um die jeweilige Verfügbarkeit zu bestätigen.
7. Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen als biogefährliche Materialien behandelt und mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Im Falle einer Exposition sind die Richtlinien der zuständigen Gesundheitsbehörden zu beachten.[23,24]
8. Kontakt der Reagenzien mit Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt von Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen mit reichlich Wasser spülen.
9. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, da dies zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.
10. Bei vorschriftsgemäßer Anwendung ist dieses Produkt nicht als gefährliche Substanz klassifiziert. Das Konservierungsmittel im Reagenz ist Natriumazid. Zu den Symptomen einer übermäßigen Exposition gegenüber Natriumazid gehören Haut- und Augenreizung sowie Reizung der Schleimhäute und der oberen Atemwege. Die Natriumazid-Konzentration in diesem Produkt beträgt 0.05 % und erfüllt nicht die Kriterien für gefährliche Substanzen. Ablagerungen von NaN_3 können mit Blei- und Kupferinstallationen hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit großer Menge Wasser spülen, um die Ansammlung von Aziden in den Abflussrohren zu vermeiden.[25] Bei empfindlichen Personen sind systemische allergische Reaktionen möglich.
11. Weiterführende Informationen zur Verwendung dieses Produkts sind dem Benutzerhandbuch des BenchMark IHC/ISH Geräts und den Gebrauchsanweisungen der benötigten Komponenten auf dialog.roche.com zu entnehmen.
12. Anweisungen zur vorschriftsmäßigen Entsorgung sind bei den zuständigen kommunalen und/oder staatlichen Behörden erhältlich.
13. Die Kennzeichnung der Produktsicherheit erfolgt in erster Linie nach der EU-GHS-Verordnung. Sicherheitsdatenblätter sind für professionelle Benutzer auf Anfrage erhältlich.
14. Bei Verdacht auf ein schwerwiegendes Ereignis im Zusammenhang mit diesem Produkt wenden Sie sich an den Roche-Vertreter vor Ort und melden das Ereignis bei der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaats bzw. des Landes, in dem sich der Benutzer befindet.

FÄRBEVERFAHREN

VENTANA primäre Antikörper wurden zur Verwendung auf BenchMark IHC/ISH Geräten in Kombination mit VENTANA Nachweiskits und Zubehör entwickelt. Die empfohlenen Färbeprotokolle sind in den folgenden Tabellen zu finden.

Dieser Antikörper wurde für spezifische Inkubationszeiten optimiert, der Benutzer sollte jedoch die mit diesem Reagenz erzielten Ergebnisse überprüfen.

Die Parameter für die automatisierten Verfahren können gemäß dem Verfahren im Benutzerhandbuch des Geräts angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden. Weitere Informationen zu immunhistochemischen Färbeverfahren können dem Methodenblatt des entsprechenden VENTANA Nachweiskits entnommen werden.

Weitere Hinweise zur ordnungsgemäßen Verwendung dieses Produkts sind dem Methodenblatt des integrierten Spenders (Art.-Nr. 790-4493) zu entnehmen.

Tabelle 1. Empfohlenes Färbeprotokoll für den VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper mit *i*VIEW DAB Detection Kit auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät.

Verfahrenstyp	Methode		
	GX	XT	ULTRA
Entparaffinisierung	Ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Zellkonditionierung (Antigendemaskierung)	CC1, Standard	CC1, Standard	ULTRA CC1, mild
Primärer Antikörper	32 Minuten, 37 °C	32 Minuten, 37 °C	24 Minuten, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	Nicht ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Gegenfärbung	Hematoxylin II, 4 Minuten		
Abschließende Gegenfärbung	Bluing, 4 Minuten		

Tabelle 2. Empfohlenes Färbeprotokoll für den VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät.

Verfahrenstyp	Methode		
	GX	XT	ULTRA oder ULTRA PLUS
Entparaffinisierung	Ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Zellkonditionierung (Antigendemaskierung)	CC1, mild	CC1, mild	ULTRA CC1, mild
Primärer Antikörper	16 Minuten, 37 °C	16 Minuten, 37 °C	12 Minuten, 36 °C
ultraWash	Ausgewählt		
Gegenfärbung	Hematoxylin II, 4 Minuten		
Abschließende Gegenfärbung	Bluing, 4 Minuten		

Durch die Unterschiede bei der Gewebefixierung und -aufbereitung sowie der allgemeinen Merkmale der verwendeten Laborgeräte und der herrschenden Laborbedingungen kann es erforderlich sein, die Inkubationsdauer für den primären Antikörper oder die Zellkonditionierung je nach verwendeten Proben und Nachweismethoden und nach Ermessen des Ablesers zu verlängern oder zu verkürzen. Weiterführende Informationen über Fixierungsvariablen siehe „Immunohistochemistry Principles and Advances".[26]

Tabelle 3 beschreibt die empfohlenen Färbeverfahren bei Brust- und Magenkarzinom.

Tabelle 3. Färbeverfahren auf BenchMark IHC/ISH Geräten.

	GX	XT	ULTRA oder ULTRA PLUS
Mammakarzinom	Färbeverfahren mit *i*VIEW DAB oder *ultra*View DAB*	Färbeverfahren mit *i*VIEW DAB oder *ultra*View DAB*	Färbeverfahren mit *i*VIEW DAB oder *ultra*View DAB*
Magenkarzinom	GX uVDAB HER2 4B5 gastrisch (Tabelle 2)	XT uVDAB HER2 4B5 gastrisch (Tabelle 2)	ULTRA uVDAB HER2 4B5 gastrisch (Tabelle 2)

* Bei Mammakarzinomproben zur Färbung auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät werden die Färbeverfahren für *i*VIEW DAB Detection Kit (Tabelle 1) oder *ultra*View Universal DAB Detection Kit (Tabelle 2) verwendet

QUALITÄTSKONTROLLVERFAHREN

Zelllinien als Systemkontrolle

Ventana bietet als eigenständige Produkte vier formalinfixierte, paraffineingebettete, geschnittene und auf einzelne geladene Objektträger aufgebrachte Zelllinienkontrollen an. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (Art.-Nr. 781-2991) können für eine Vorabvalidierung der für das Färben von Objektträgern mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper gewählten Aufarbeitungsmethode nützlich sein. Diese vier Zelllinien-Kontrollen sind hinsichtlich der Anzahl der Genkopien durch In-situ-Hybridisierung charakterisiert (Tabelle 4). Bei korrekter Aufbereitung und Färbung zeigen die Zelllinien das im Methodenblatt von PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide beschriebene Färbeergebnis. Wenn bei den entsprechenden Schnitten, insbesondere in den Kontrollen mit Score 1+ und 2+, keine erwartete Färbung vorliegt, sollte die Färbung der Gewebe wiederholt werden.

Tabelle 4. Eigenschaften von PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

HER2 IHC-Score	Zelllinie	HER2/Chr17-Verhältnis*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* Das HER2/Chr17-Verhältnis ist der Durchschnitt der drei Chargen von PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, der mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt wurde.

POSITIVE GEWEBEKONTROLLE

Bei allen Testbedingungen und bei jedem mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper durchgeführten Färbeverfahren ist positives Kontrollgewebe mitzuführen, das auf die gleiche Weise wie die Patientenproben fixiert und aufbereitet wird. Es ist optimale Laborpraxis, einen positiven Kontrollschnitt auf denselben Objektträger zu platzieren, auf dem sich auch das Testgewebe befindet. Auf diese Weise können Fehler bei Anwendung der Reagenzien auf den Objektträger erkannt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist zur Qualitätskontrolle am besten geeignet. Kontrollgewebe kann sowohl positiv als auch negativ färbende Bestandteile enthalten und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden. Das Kontrollgewebe muss eine frische Probe einer Autopsie, Biopsie oder eines chirurgischen Eingriffs sein und so schnell wie möglich auf identische Weise wie die Probenschnitte präpariert oder fixiert werden.

Mit diesem Gewebe können alle Analyseschritte von der Gewebepräparation bis zu Färbung kontrolliert werden. Die Verwendung eines Gewebeschnitts, der anders als die Testprobe fixiert oder aufgearbeitet wurde, ermöglicht die Kontrolle aller Reagenzien und Methodenschritte mit Ausnahme der Fixierung und Gewebevorbereitung. Idealerweise sollte ein Gewebe gewählt werden, von dem bekannt ist, dass es eine schwache, aber positive Färbung aufweist, um sicherzustellen, dass das System Sensitivität gegenüber einem geringfügigen Reagenzabbau oder Problemen mit der IHC-Methodik zeigt. Im Allgemeinen ist neoplastisches Gewebe, das positiv auf HER2 ist, aufgrund der Art der Pathologie (Überexpression) jedoch stark positiv.

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der Leistung von Reagenzien und Geräten verwendet werden und nicht als Unterstützung bei der Erstellung einer spezifischen Diagnose von Testproben. Wenn mit der positiven Gewebekontrolle keine positive Färbung nachgewiesen werden kann, gelten die Ergebnisse der Testprobe als ungültig.

Ein Beispiel für eine Positivkontrolle für den VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper ist eine Probe eines bekanntermaßen schwach HER2-positiven invasiven Mammakarzinoms oder eines schwach positiven Magenkarzinoms. Die positiv färbenden Gewebebestandteile (Membranfärbung neoplastischer Zellen) dienen zur Bestätigung, dass der Antikörper aufgetragen wurde und das Gerät korrekt funktioniert hat.

Negative Gewebekontrolle

Derselbe Objektträger, der für die positive Gewebekontrolle verwendet wird (duktales oder lobuläres invasives Mammakarzinom oder Magenkarzinom), kann auch als negative Gewebekontrolle dienen. Die nicht färbenden Bestandteile (umgebendes Stroma, lymphoide Zellen und Blutgefäße) sollten keine spezifische Färbung aufweisen und können zur Beurteilung der spezifischen Hintergrundfärbung (falsch positive Färbung) mit dem primären Antikörper verwendet werden. Es ist bekanntermaßen negatives Gewebe zu verwenden, das auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet worden ist.

Negative Reagenzkontrolle

Für jede Probe muss eine negative Reagenzkontrolle durchgeführt werden, um die Interpretation der Ergebnisse zu unterstützen. Eine negative Reagenzkontrolle wird anstelle des primären Antikörpers zur Bewertung von unspezifischer Färbung durchgeführt. Dieser Objektträger muss mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig gefärbt werden. Die Inkubationsdauer für die negative Reagenzkontrolle sollte der für die primären Antikörper geltenden Inkubationsdauer entsprechen.

Ungeklärte Diskrepanzen

Wenn ungeklärte Diskrepanzen in Kontrollen auftreten, umgehend den zuständigen Kundendienst benachrichtigen. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle nicht den Spezifikationen entsprechen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Es ist der Abschnitt zur Fehlerbehebung zu beachten. Das Problem muss identifiziert und behoben werden. Anschließend sind die Patientenproben erneut zu testen.

Assay-Verifizierung

Vor der ersten Verwendung eines Antikörpers oder Färbesystems in einem Diagnoseverfahren muss die Spezifität des Antikörpers überprüft werden. Zu diesem Zweck wird er auf einer Reihe von Gewebeproben mit bekannten Immunhistochemie-Leistungsmerkmalen getestet, die bekannte positive und negative Gewebekomponenten enthalten müssen (siehe hierzu die weiter oben in dieser Produktbeilage ausgeführten Hinweise zu Qualitätskontrollverfahren und die Empfehlungen zur Qualitätskontrolle in der Anatomic Pathology Checklist des College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program[27] und/oder die CLSI Approved Guideline[28]). Die Qualitätskontrollverfahren müssen für jede neue Antikörpercharge und bei jeder Änderung der Assay-Parameter wiederholt werden. Für die Assay-Verifizierung sind Mamma- und Magenkarzinomgewebe mit bekanntem HER2-Status geeignet.

AUSWERTUNG DER FÄRBUNG / ERWARTETE ERGEBNISSE

Das automatisierte VENTANA Immunfärbeverfahren bewirkt, dass an den Stellen, an denen das Antigen von dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper lokalisiert wurde, ein braungefärbtes Diaminobenzidin (DAB)-Reaktionsprodukt ausfällt. Bevor die Ergebnisse interpretiert werden können, muss ein qualifizierter, mit immunhistochemischen Verfahren vertrauter Pathologe zunächst die Kontrollen auswerten und das gefärbte Produkt qualifizieren.

Positive Kontrollen

Die gefärbte positive Gewebekontrolle sollte zuerst überprüft werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien korrekt funktionieren. Positive Reaktivität ist an dem Vorhandensein eines korrekt gefärbten Reaktionsprodukts in der Membran der Zielzellen erkennbar. Abhängig von der Inkubationsdauer und der Stärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer blass- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung aufweisen, gelten alle Ergebnisse der Testproben als ungültig.

Negative Gewebekontrollen

Nach der positiven Gewebekontrolle sollte die negative Gewebekontrolle untersucht werden, um die spezifische Markierung des Zielantigens durch den primären Antikörper zu verifizieren. Das Fehlen einer spezifischen Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt das Fehlen einer Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zellen oder Zellbestandteilen. Wenn das Gewebe gegengefärbt ist, kann eine Färbung im Außenbereich der Zellen, d. h. im Interstitium, vorhanden sein. Wenn in der negativen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung vorhanden ist, gelten die Ergebnisse mit der Patientenprobe als ungültig.

Negative Reagenzkontrollen

Sofern vorhanden, hat eine unspezifische Färbung ein diffuses Muster. In Gewebeschnitten, die sehr stark formalinfixiert sind, kann eine sporadische leichte Färbung des Bindegewebes festgestellt werden. Für die Interpretation der Färbeergebnisse sollten intakte Zellen verwendet werden, da nekrotische oder degenerierte Zellen häufig eine unspezifische Färbung annehmen.

Patientengewebe

Patientenproben sollten zuletzt untersucht werden. Die Intensität der positiven Färbung sollte in Relation zu der Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle eingestuft werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist. Bei jeder Gewebeprobe sollte im Zusammenhang mit der Interpretation eines immunhistochemisches Ergebnisses auch die Morphologie unter Verwendung eines mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitts untersucht werden. Die morphologischen Ergebnisse eines Patienten und die dazugehörigen klinischen Daten müssen von einem qualifizierten Pathologen ausgewertet werden.

Ein qualifizierter, mit immunhistochemischen Verfahren vertrauter Pathologe muss zunächst die positiven und negativen Gewebekontrollen auswerten und das gefärbte Produkt qualifizieren, bevor die Ergebnisse interpretiert werden können.

Kriterien zur Bewertung der Ergebnisse mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper bei Mammakarzinom

Mammakarzinome, die hinsichtlich einer Überexpression von HER2-Protein als positiv gelten, müssen die Schwellenwertkriterien in Bezug auf die Intensität der Färbung (2+ oder stärker auf einer Skala von 0 bis 3+) und den prozentualen Anteil positiver Tumorzellen (mehr als 10 %) erfüllen. Darüber hinaus muss sich die Färbung an der Zellmembran befinden. Eine zytoplasmatische Färbung kann zwar vorhanden sein, wird aber nicht in die Bestimmung des Positivitätsstatus einbezogen. Es ist der gesamte Gewebeschnitt zu überprüfen, um sicherzustellen, dass nur gut erhaltene und gut gefärbte Bereiche bewertet werden. Eine vollständig umlaufende Färbung der Zytoplasmamembran ist mit einer Intensität von „2+“ oder „3+“ zu bewerten. Eine partielle Färbung der Membran ist mit „1+“ zu bewerten. Grenzfälle müssen eventuell bei 40-facher oder höherer Vergrößerung untersucht werden, um zwischen Intensitäten von „1+“ und „2+“ zu unterscheiden. Im Gegensatz zu Fällen mit einer Intensität von 3+ ist der Ring bei einer Färbung mit Intensität von 2+ schärfer und klarer, während der Umriss bei einer Intensität von 3+ relativ dick erscheint. Nachstehend ist eine Kurzübersicht der Kriterien zur Beurteilung des Färbeergebnisses aufgeführt. In der *Interpretationsanleitung für VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody zur Färbung von Mamma- und Magenkarzinom* (Art.-Nr. 1012716) ist eine ausführlichere Beschreibung mit Fotos der Färbeergebnisse mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper enthalten.

Tabelle 5. Kriterien zur Bewertung der Intensität und des Musters der Zellmembranfärbung mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper bei Mammakarzinom.

Färbemuster	Score (Befund für den behandelnden Arzt)	Beurteilung der HER2-Färbung
Keine Membranfärbung beobachtet	0	Negativ
Schwache Teilfärbung der Membran bei einem beliebigen Anteil der Krebszellen	1+	Negativ
Schwache bis mittelstarke, vollständige Färbung der Membran bei > 10 % der Krebszellen	2+	Nicht eindeutig*

Färbemuster	Score (Befund für den behandelnden Arzt)	Beurteilung der HER2-Färbung
Intensive vollständige Färbung der Membran bei > 10 % der Krebszellen	3+	Positiv

* Es wird empfohlen, auf ISH zurückzugreifen.

Kriterien zur Bewertung der Ergebnisse mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper bei Magenkarzinom

Magenkarzinome, die hinsichtlich einer Überexpression von HER2-Protein als positiv zu betrachten sind, müssen die Schwellenwertkriterien in Bezug auf die Intensität und das Muster der Membranfärbung (2+ oder stärker auf einer Skala von 0 bis 3+) und den prozentualen Anteil positiver Tumorzellen erfüllen. Die Färbung muss auf der Zellmembran lokalisiert, jedoch nicht zwingend vollständig umlaufend sein, da häufig eine basolaterale Färbung festzustellen ist und für die Bewertung berücksichtigt werden sollte. Es kann eine Färbung des Zytoplasmas und/oder des Zellkerns vorhanden sein, diese Färbung wird jedoch nicht in die Bestimmung der Positivität einbezogen. Beim Magenkarzinom hängt der Prozentsatz positiver Tumorzellen davon ab, ob es sich bei der Probe um eine Biopsieprobe (≥ 5 kohäsive Zellen) oder um eine Resektionsprobe (≥ 10 %) handelt.

Bei der Festlegung der Bewertungsrichtlinien für die HER2-Immunhistochemie bei Magenkrebs ist zu beachten, dass eine starke Membranfärbung zwar ein Hinweis auf eine Überexpression des HER2-Proteins in neoplastischen Zellen ist, jedoch nicht zwingend vollständig umlaufend sein muss.[29]

Es wurde über eine diffuse zytoplasmatische Färbung mit oder ohne Kernfärbung bei Magenkrebs berichtet.[30] Zur Bestimmung der HER2-Proteinexpression bei Magenkrebs sollte jedoch nur die Membranfärbung berücksichtigt werden.

Die immunhistochemische Färbung mit dem Klon 4B5 kann eine zytoplasmatische und nukleäre Färbung der normalen Magenschleimhaut und seltener von neoplastischen Zellen bei Magenkarzinom und Magen-/Ösophaguskarzinom erzeugen. Wie diese zytoplasmatische und nukleare Färbung zustande kommt, ist derzeit nicht bekannt. Dieses Färbemuster sollte nicht mit der diskreten Membranfärbung verwechselt werden, da diese auf eine HER2-Positivität in neoplastischen Zellen hinweist.

Die *Interpretationsanleitung für VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody zur Färbung von Mamma- und Magenkarzinom* enthält eine ausführlichere Beschreibung mit Fotos der Färbeergebnisse mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper.

Tabelle 6. Kriterien zur Bewertung der Intensität und des Musters der Zellmembranfärbung mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper bei Magenkarzinom.

Färbemuster – Resektionsprobe	Färbemuster – Biopsieprobe	Score (Befund für den anfordernden Arzt)	Beurteilung der HER2-Färbung
Keine Reaktivität oder membranäre Reaktivität in < 10 % der Tumorzellen	Keine Reaktivität oder membranäre Reaktivität in Tumorzellen	0	Negativ
Schwache/kaum wahrnehmbare membranäre Reaktivität bei ≥ 10 % der Tumorzellen; Zellen sind nur an einem Teil ihrer Membran reaktiv	Tumorzellcluster* mit schwacher/kaum wahrnehmbarer membranärer Reaktivität, unabhängig vom Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen	1+	Negativ
Schwache bis moderate basolaterale oder laterale membranäre Reaktivität in ≥ 10 % der Tumorzellen	Tumorzellcluster* mit schwacher bis moderater vollständiger, basolateraler oder lateraler membranärer Reaktivität, unabhängig vom Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen	2+	Nicht eindeutig**
Starke vollständige, basolaterale oder laterale membranäre Reaktivität in ≥ 10 % der Tumorzellen	Tumorzellcluster* mit starker vollständiger, basolateraler oder lateraler membranärer Reaktivität, unabhängig vom Prozentsatz der gefärbten Tumorzellen	3+	Positiv

* ≥ 5 kohäsive Zellen

** Es wird empfohlen, auf ISH zurückzugreifen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Allgemeine Einschränkungen

1. Die Immunhistochemie ist ein aus mehreren Schritten bestehendes Diagnoseverfahren, das hinsichtlich der Wahl der geeigneten Reagenzien und Gewebeproben sowie bezüglich Fixierung, Aufbereitung und Vorbereitung der Immunhistochemieobjektträger und der Interpretation der Färbeergebnisse eine besondere Schulung erfordert.
2. Die Gewebefärbung ist von sachgemäßer Behandlung und Aufbereitung des Gewebes vor dem Färben abhängig. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder die Kontamination mit anderen Geweben oder mit Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder von dem Gewebe inhärenten Unregelmäßigkeiten sein.
3. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Die klinische Interpretation einer positiven Gewebefärbung oder deren Fehlen muss im Kontext der klinischen Vorgeschichte, der Morphologie und sonstiger histopathologischer Kriterien erfolgen. Die klinische Interpretation einer eventuellen Färbung oder deren Fehlen muss durch morphologische Untersuchungen und geeignete Kontrollen sowie durch andere diagnostische Tests ergänzt werden. Der qualifizierte Pathologe muss zur Auswertung der gefärbten Präparate mit den zur Färbung verwendeten Antikörpern, Reagenzien und Methoden vertraut sein. Die Färbung muss in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter der Aufsicht eines Pathologen durchgeführt werden, der für die Überprüfung der gefärbten Objektträger sowie die Sicherstellung adäquater positiver und negativer Kontrollen verantwortlich ist.
5. VENTANA Antikörper und Reagenzien werden in der optimalen Konzentration zur Verwendung entsprechend der Gebrauchsanweisung geliefert. Abweichungen von den empfohlenen Testverfahren können die erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt und dokumentiert werden. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.

6. Dieses Produkt ist nicht auf die Anwendung in der Durchflusszytometrie ausgelegt, und es liegen keine Leistungsmerkmale vor.
7. Bei Gewebe, das im Vorfeld nicht getestet wurde, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Variabilität der Antigenexpression in Neoplasien oder anderen pathologischen Geweben können unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden.[31] Wenn unerwartete Reaktionen dokumentiert werden, ist der zuständige Kundendienst zu benachrichtigen.
8. Gewebeproben von Personen mit Hepatitis-B-Infektion und mit dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettich-Peroxidase eine unspezifische Färbung aufweisen.[32]
9. Falsch positive Ergebnisse können durch nicht immunologische Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten entstehen. Sie können je nach Art der verwendeten Immunfärbung auch durch Pseudoperoxidase-Aktivität (Erythrozyten), endogene Peroxidase-Aktivität (Cytochrom C) oder endogenes Biotin (Beispiel: Leber, Gehirn, Brust, Niere) verursacht werden.[33]
10. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis lediglich, dass das fragliche Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht jedoch, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben nicht vorhanden ist.

SPEZIFISCHE EINSCHRÄNKUNGEN

Wie in Tabelle 1 und Tabelle 2 angegeben, wurde dieser Antikörper für BenchMark IHC/ISH Geräte und chemische Nachweisverfahren optimiert. Aufgrund von Unterschieden bei der Gewebefixierung und -aufbereitung ist es eventuell erforderlich, die Inkubationsdauer für den primären Antikörper auf einzelnen Proben zu verlängern oder zu verkürzen. Weiterführende Informationen über Fixierungsvariablen siehe „Immunohistochemistry Principles and Advances“.[26]

In Kombination mit VENTANA Nachweiskits und Hilfsreagenzien erkennt der Antikörper Antigen, das auch nach routinemäßiger Formalinfixierung, Gewebeaufbereitung und Schneiden noch vorhanden ist. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation und Validierung der Patientenergebnisse.

Es wurde keine Überprüfung der Spezifität mit Knochenmark durchgeführt. Der Benutzer sollte vor Interpretation des Färbeergebnisses die Angemessenheit der Färbung in den oben genannten Geweben bestimmen.

Die immunhistochemische Färbung mit dem Klon 4B5 kann eine zytoplasmatische und nukleäre Färbung der normalen Magenschleimhaut und seltener von neoplastischen Zellen bei Magenkarzinom und Magen-/Ösophaguskarzinom erzeugen. Wie diese zytoplasmatische und nukleare Färbung zustande kommt, ist derzeit nicht bekannt. Dieses Färbemuster sollte nicht mit der diskreten Membranfärbung verwechselt werden, die auf eine HER2-Positivität in neoplastischen Zellen hinweist.

Es sind möglicherweise nicht alle Assays auf jedem Gerät registriert. Weitere Informationen erhalten Sie von Ihrem Roche-Vertreter vor Ort.

LEISTUNGSMERKMALE

Es wurden Färbetests auf Sensitivität, Spezifität und Präzision durchgeführt; die Ergebnisse sind unten aufgeführt.

ANALYTISCHE LEISTUNG

Sensitivität und Spezifität

Sensitivität/Spezifität des VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörpers wurden mit einer Studie bestimmt, in der bei den meisten normalen Geweben keine spezifische Membranfärbung festgestellt wurde. Die Färbeergebnisse sind in Tabelle 7 aufgeführt. Sensitivität und Spezifität des VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörpers wurden außerdem mit einer Studie bestimmt, in der bei den meisten neoplastischen Geweben keine spezifische Membranfärbung festgestellt wurde. Die Färbeergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Färbungen zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden unter Anwendung des *i*VIEW DAB Detection Kit Protokolls auf einem BenchMark XT Gerät oder unter Anwendung des *ultra*View Universal DAB Detection Kit Protokolls auf einem vorstehend aufgeführten BenchMark ULTRA Gerät durchgeführt.

Positive Färbung bei Tonsillenepithel-, Speiseröhrenepithel-, Prostata-, peripherem Nerven-, Nebenschilddrüsen- Brustkrebs-, Kolon- und Ovarialkarzinomgewebe stimmen mit den Daten in der veröffentlichten Literatur zur Expression von HER2 überein.

Tabelle 7. Sensitivität/Spezifität des VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörpers wurden durch das Testen von normalem FFPE-Gewebe ermittelt.

Gewebe	Anzahl positiver/aller Fälle	Gewebe	Anzahl positiver/aller Fälle
Großhirn	0/6	Dünndarm	0/6
Kleinhirn	0/6	Dickdarm	0/46
Nebenniere	0/6	Leber	0/6
Eierstock	0/6	Speicheldrüse	0/3
Bauchspeicheldrüse	0/6	Zunge	0/3
Lymphknoten	0/12	Niere	0/6
Hirnanhangsdrüse	0/5	Prostata	1/6
Hoden	0/6	Blase [b]	3/3
Schilddrüse	0/6	Rektum	0/6
Brust	0/14	Nebenschilddrüse[c]	4/6
Milz	0/6	Gebärmutterschleim-haut	0/3
Tonsille[a]	3/6	Gebärmutter	0/3
Thymus	0/5	Gebärmutterhals	0/5
Knochenmark	0/3	Endozervix	0/1
Lunge	0/6	Skelettmuskel	0/6
Herz	0/5	Haut	0/6
Perikard	0/3	Nerv	2/6
Speiseröhre	1/6	Mesothel	0/3
Magen	0/11	N/A	N/A

[a] fokale Färbung von Oberflächenepithelzellen

[b] Membranfärbung oberflächlicher Deckzellen

[c] fokale Membranfärbung

Tabelle 8. Sensitivität/Spezifität des VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörpers wurden durch das Testen von verschiedenen neoplastischen FFPE-Geweben ermittelt.

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Glioblastom (Cerebrum)	0/2
Meningeom (Cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (Cerebrum)	0/1
Seröses Adenokarzinom (Ovarien)	0/2
Karzinom, NOS, (nicht näher bestimmt) (Ovarien)	1/2
Neuroendokrine Neoplasie (Pankreas)	0/1
Adenokarzinom (Pankreas)	0/1
Karzinom, NOS (Pankreas)	0/3
Seminom (Hoden)	0/1

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Embryonalkarzinom (Hoden)	0/1
Medulläres Karzinom (Schilddrüse)	0/1
Papilläres Karzinom (Schilddrüse)	0/1
Karzinom, NOS (Schilddrüse)	0/3
Mikroinvasives duktales Karzinom (Brust)	2/2
Invasives duktales Karzinom (Brust)	44/99
Karzinom, NOS (Brust)	1/4
Kleinzelliges Karzinom (Lunge)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Lunge)	0/1
Karzinom, NOS (Lunge)	0/2
Adenokarzinom (Lunge)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Ösophagus)	0/1
Adenokarzinom (Ösophagus)	0/1
Muzinöses Adenokarzinom (Magen)	0/4
Adenokarzinom (Magen)	8/88
Siegelringzellkarzinom (Magen)	0/4
Karzinom, NOS (Magen)	0/3
Adenokarzinom (Dünndarm)	0/1
Gastrointestinaler Stromatumor (Dünndarm)	0/1
Adenokarzinom (Kolon)	0/32
Gastrointestinaler Stromatumor (Kolon)	0/1
Karzinom, NOS (Kolon)	1/3
Adenokarzinom (Rektum)	1/5
Gastrointestinaler Stromatumor (Rektum)	0/1
Melanom (Rektum)	0/1
Hepatozelluläres Karzinom (Leber)	0/3
Hepatoblastom (Leber)	0/1
Karzinom, NOS (Leber)	0/3
Klarzellkarzinom (Niere)	0/1
Karzinom, NOS (Niere)	0/5
Adenokarzinom (Prostata)	0/2
Karzinom, NOS (Prostata)	0/3
Leiomyom	0/3
Adenokarzinom (Uterus)	0/1
Klarzellkarzinom (Uterus)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Zervix)	0/2

Pathologie	Anzahl positiver/aller Fälle
Embryonales Rhabdomyosarkom (quergestreifte Muskulatur)	0/1
Basalzellkarzinom (Haut)	0/1
Plattenepithelkarzinom (Haut)	1/1
Neurofibrom (lumbal)	0/1
Neuroblastom (Retroperitoneum)	0/1
Mesotheliom (Peritoneum)	0/1
Pleomorphes Rhabdomyosarkom (Peritoneum)	0/1
Lymphom, NOS	0/3
B-Zell-Lymphom, NOS (Milz)	0/1
B-Zell-Lymphom, NOS (Lymphknoten)	0/2
Hodgkin-Lymphom (Lymphknoten)	0/1
Urothelkarzinom (Blase)	1/1
Leiomyosarkom (Blase)	0/1
Osteosarkom (Knochen)	0/1
Leiomyosarkom (glatte Muskulatur)	0/1
Rektum-Adenokarzinom (metastasiert)	0/1
Kolon-Adenokarzinom (metastasiert)	0/7
Muzinöses Kolon-Adenokarzinom (metastasiert)	0/1
Melanom	0/2
Neuroendokrine Neoplasie, NOS	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Undifferenziertes Karzinom, NOS	0/1

Analytische Leistung bei Brustkrebsfällen

Leistungsmerkmale auf dem BenchMark ULTRA Gerät unter Verwendung von *i*VIEW DAB Detection Kit oder *ultra*View Universal DAB Detection Kit

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit und Inter-Tage-Reproduzierbarkeit auf dem BenchMark ULTRA Gerät: An der Studie zur Inter-Labor-Reproduzierbarkeit nahmen drei Labore von verschiedenen Institutionen in den Vereinigten Staaten teil. Jede Einrichtung erhielt Schnitte von FFPE-Geweben von 48 Fällen eines invasiven Mammakarzinoms [jeweils 12 aus jeder HER2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)] und 1 Paar PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides für jeden von 12 Färbeläufen zur Färbung auf einem BenchMark ULTRA Gerät mit dem empfohlenen Färbeprotokoll und *ultra*View Universal DAB Detection Kit. Als Kontrollen wurden PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und ein mit negativem Ig-Reagenz gefärbter, zweiter Objektträger von jedem Fall verwendet. Die gegenüber dem Fallstatus verblindeten Pathologen vergaben einen klinischen Score zur Bewertung der Objektträger (d. h. 0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse wurden von Ventana ausgewertet. Unter Verwendung der Standardnomenklatur für 2x2-Tabellen wurde die durchschnittliche positive Übereinstimmung (APA) aller Einrichtungen als [2a/(2a+b+c)] und die durchschnittliche negative Übereinstimmung (ANA) als [2d/(2d+b+c)] berechnet. Auf der Grundlage der klinischen Bewertung (positiv, negativ) betrug die APA zwischen den Einrichtungen 90.0 % (108/120) und die ANA 92.9 % (156/168). Für den paarweisen Vergleich der Einrichtungen wurde die APA als a/(a+c) und die ANA als d/(b+d) berechnet. Die APA zwischen den Einrichtungen A und B betrug 93.0 % (40/43), zwischen den Einrichtungen A und C 87.2 % (34/39) und zwischen den Einrichtungen B und C

89.5 % (34/38). Die ANA zwischen den Einrichtungen A und B betrug 94.3 % (50/53), zwischen den Einrichtungen A und C 91.2 % (52/57) und zwischen den Einrichtungen B und C 93.1 % (54/58).

Bei den folgenden Tabellen handelt es sich um 3x3-Darstellungen der Ergebnisse jedes Ablesers basierend auf der klinischen Beurteilung, wobei 2+ und 3+ separiert wurden.

Tabelle 9. 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate zwischen Einrichtung A und Einrichtung B – Klon 4B5 BenchMark ULTRA Gerät unter Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Einrichtung B			
Einrichtung A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Gesamt	12	9	27	48
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)	43/48 (**89.6**)			

Tabelle 10. 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate zwischen Einrichtung A und Einrichtung C – Klon 4B5 BenchMark ULTRA Gerät unter Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Einrichtung C			
Einrichtung A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Gesamt	12	5	31	48
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)	42/48 (**87.5**)			

Tabelle 11. 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate zwischen Einrichtung B und Einrichtung C – Klon 4B5 BenchMark ULTRA Gerät unter Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Einrichtung C			
Einrichtung B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Gesamt	12	5	31	48
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)	44/48 (**91.7**)			

Inter-Tage-Reproduzierbarkeit der Färbung auf dem BenchMark ULTRA Gerät

Zur Ermittlung der Inter-Tage-Reproduzierbarkeit (IDR) in der Studie wurden 12 Fälle mit einer beabsichtigten Verteilung von ungefähr drei (3) Fällen je klinischem Score (0, 1+, 2+, 3+) verwendet. Insgesamt fanden die fünf Läufe auf dem BenchMark ULTRA Gerät an der für die Durchführung der Überprüfung der IDR zuständigen Einrichtung C über einen Zeitraum von mindestens 20 Tagen statt, sodass die Färbungen nie an zwei Tagen hintereinander durchgeführt wurden. Basierend auf der klinischen Bewertung der Färbung mit Klon 4B5 in Einrichtung C an allen Tagen betrugen die APA und die ANA der IDR jeweils 100 %. Die prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) auf der Grundlage der klinischen Bewertungen betrugen für jeden Inter-Tage-Vergleich und für alle Tage kombiniert jeweils 100 %.

Studie zum Vergleich zwischen dem BenchMark ULTRA und dem BenchMark XT Gerät

An der Studie zum Vergleich zwischen Plattformen beteiligten sich zwei Färbelabore und drei ablesende Einrichtungen in den USA. Zwei Färbelabore erhielten per Zufallszuteilung Schnitte von FFPE-Geweben von 280 Fällen eines invasiven Mammakarzinoms [etwa 70 Fälle aus jeder HER2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)] (140 Fälle je Einrichtung) zur Färbung auf einem BenchMark XT und einem BenchMark ULTRA Gerät mit dem jeweils empfohlenen Färbeprotokoll und *ultra*View Universal DAB Detection Kit. Als Kontrollen wurden PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und ein mit negativem Ig-Reagenz gefärbter, zweiter Objektträger von jedem Fall verwendet. Gefärbte Fälle von Einrichtung 1 und Einrichtung 2 wurden in vier Objektträger-Reihen aufgeteilt. Jeweils eine Reihe wurde drei verschiedenen qualifizierten Ablesern (Pathologen) zur Verfügung gestellt, d. h. einem Ableser an Einrichtung 1, einem Ableser an Einrichtung 2 und einem Ableser an Einrichtung 3. Die gegenüber dem Fallstatus und der Färbeplattform verblindeten Pathologen bewerteten alle vier Objektträger-Reihen und vergaben für jeden Fall einen klinischen Score (d. h., 0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse wurden von Ventana ausgewertet. Die PPA (und die untere Grenze des zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalls) für die Färbung mit dem Klon 4B5 Antikörper auf dem BenchMark ULTRA Gerät im Vergleich mit dem BenchMark XT Gerät basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrug bei Ableser A 91.6 % (85.9), bei Ableser B 91.2 % (85.3) und bei Ableser C 94.9 % (89.3). Die NPA (und die untere Grenze des zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalls) für die Färbung mit dem Klon 4B5 Antikörper auf dem BenchMark ULTRA Gerät im Vergleich mit dem BenchMark XT Gerät basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrug bei Ableser A 91.9 % (85.8), bei Ableser B 93.8 % (88.3) und bei Ableser C 99.3 % (96.3). Die OPA für die Färbung mit dem Klon 4B5 Antikörper auf dem BenchMark ULTRA Gerät im Vergleich mit dem BenchMark XT Gerät basierend auf einer 2x2-Analyse der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrug bei Ableser A 91.8 %, bei Ableser B 92.5 % und bei Ableser C 97.4 %. Die nachstehenden Tabellen enthalten 3x3-Darstellungen der Inter-Plattform-Übereinstimmungsraten für jeden Ableser basierend auf dem klinischen Score (0/1+, 2+, 3+).

Tabelle 12. 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmung zwischen dem BenchMark ULTRA und dem BenchMark XT Gerät – Ableser A.

BenchMark ULTRA Gerät	**BenchMark XT Gerät**			
Ableser A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Gesamt	96	47	124	267
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	226/267 (**84.6**) (79.8–88.5)			

Tabelle 13. 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmung zwischen dem BenchMark ULTRA und dem BenchMark XT Gerät – Ableser B.

BenchMark ULTRA Gerät	**BenchMark XT Gerät**			
Ableser B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Gesamt	69	68	130	267
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	242/267 (**90.6**) (86.5–93.6)			

Tabelle 14. 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmung zwischen dem BenchMark ULTRA und dem BenchMark XT Gerät – Ableser C.

BenchMark ULTRA Gerät	BenchMark XT Gerät			
Ableser C	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Gesamt	66	52	149	267
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	257/267 (**96.3**) (93.2–98.0)			

Inter-Pathologen-Reproduzierbarkeit bei Verwendung der Proben aus der Studie zum Vergleich der Geräte

Für die sechs möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den Ablesern für jede Plattform wurden die Raten der positiven und der negativen Übereinstimmungen mit zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervallen berechnet.

Auf dem BenchMark ULTRA Gerät betrug die PPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B 94.7 % (126/133), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 98.2 % (111/113), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 98.2 % (111/113), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 89.4 % (126/141), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 78.7 % (111/141) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 83.5 % (111/133). Die NPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B betrug 88.8 % (119/134), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 80.5 % (124/154), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 85.7 % (132/154), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 94.4 % (119/126), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 98.4 % (124/126) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 98.5 % (132/134). Die OPA war zwischen Ableser A und Ableser B am höchsten (91.8 %) und zwischen Ableser B und Ableser C und zwischen Ableser A und Ableser C (91.0 % bzw. 88.8 %) am niedrigsten.

Auf dem BenchMark XT Gerät betrug die PPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B 94.9 % (130/137), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 98.3 % (116/118), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 98.3 % (116/118), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 90.9 % (130/143), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 81.1 % (116/143) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 84.7 % (116/137). Die NPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B betrug 90.0 % (117/130), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 81.9 % (122/149), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 85.9 % (128/149), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 94.4 % (117/124), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 98.4 % (122/124) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 98.5 % (128/130). Die OPA war zwischen Ableser A und Ableser B am höchsten (92.5 %) und zwischen Ableser B und Ableser C und zwischen Ableser A und Ableser C (91.4 % bzw. 89.1 %) am niedrigsten.

Studie zum Vergleich zwischen *i*VIEW DAB Detection Kit und *ultra*View Universal DAB Detection Kit

Die Serie von FFPE-Geweben von 140 Fällen eines invasiven Mammakarzinoms der Kohorte in Einrichtung 1 [etwa 35 Fälle aus jeder HER-2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)] wurde in einer Studie zum Vergleich zwischen *i*VIEW DAB Detection Kit und *ultra*View Universal DAB Detection Kit bei der Färbung mit Klon 4B5 auf dem BenchMark ULTRA Gerät verwendet. An der Studie zum Vergleich der Nachweiskits beteiligten sich ein Immunlabor und drei ablesende Einrichtungen in den USA. Bei der Färbung mit dem Klon 4B5 Antikörper auf dem BenchMark ULTRA Gerät betrug die PPA zwischen den unter Verwendung von *i*VIEW DAB Detection Kit und *ultra*View Universal DAB Detection Kit erhaltenen Ergebnissen basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) bei Ableser A 95.8 % (68/71), bei Ableser B 96.9 % (63/65) und bei Ableser C 96.5 % (55/57). Die NPA der Nachweismethoden betrug bei Ableser A 90.8 % (59/65), bei Ableser B 91.5 % (65/71) und bei Ableser C 97.5 % (77/79). Die OPA der Nachweiskits betrug bei Ableser A 93.4 % (127/136), bei Ableser B 94.1 % (128/136) und bei Ableser C 97.1 % (132/136). Die nachstehenden Tabellen enthalten 3x3-Darstellungen der Übereinstimmungsraten beim Vergleich der Nachweismethoden für jeden Ableser basierend auf dem klinischen Score (0/1+, 2+, 3+).

Tabelle 15. 3x3-Analyse der Übereinstimmungsraten, Ableser A, *i*VIEW DAB Detection Kit vs. *ultra*View Universal DAB Detection Kit – Färbung mit dem Klon 4B5 auf einem BenchMark ULTRA Gerät.

*i*VIEW DAB Detection Kit	*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
Ableser A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Gesamt	46	25	65	136
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	119/136 (**87.5**) (80.9–92.0)			

Tabelle 16. 3x3-Analyse der Übereinstimmungsraten, Ableser B, *i*VIEW DAB Detection Kit vs. *ultra*View Universal DAB Detection Kit – Färbung mit dem Klon 4B5 auf einem BenchMark ULTRA Gerät.

*i*VIEW DAB Detection Kit	*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
Ableser B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Gesamt	33	32	71	136
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	128/136 (**94.1**) (88.8–97.0)			

Tabelle 17. 3x3-Analyse der Übereinstimmungsraten, Ableser C, *i*VIEW DAB Detection Kit vs. *ultra*View Universal DAB Detection Kit – Färbung mit dem Klon 4B5 auf einem BenchMark ULTRA Gerät.

*i*VIEW DAB Detection Kit	*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
Ableser C	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Gesamt**
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Gesamt	32	25	79	136
Prozentuale Gesamtübereinstimmung: n/N (%) (95 %-KI)	132/136 (**97.1**) (92.7–98.9)			

Inter-Pathologen-Nachweisreproduzierbarkeit bei Verwendung der Proben aus der Vergleichsstudie:

Für die sechs möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den Ablesern für jede Methode wurden die Raten der positiven und der negativen Übereinstimmungen mit zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervallen berechnet.

Bei Verwendung von *i*VIEW DAB Detection Kit betrug die PPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B 100.0 % (69/69), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 98.2 % (56/57), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 96.5 % (55/57), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 93.2 % (69/74), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 75.7 % (56/74) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 79.7 % (55/69). Die NPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B betrug 92.5 % (62/67), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 77.2 % (61/79), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 82.3 % (65/79), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 100.0 % (62/62), beim Vergleich zwischen

Ableser C und Ableser A 98.4 % (61/62) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 97.0 % (65/67). Die Gesamtübereinstimmung war zwischen Ableser A und Ableser B am höchsten (96.3 %) und zwischen Ableser A und Ableser C und zwischen Ableser B und Ableser C niedriger (86.0 % bzw. 88.2 %).

Bei Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit betrug die PPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B 96.9 % (63/65), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 98.2 % (56/57), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 98.2 % (56/57), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 88.7 % (63/71), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 78.9 % (56/71) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 86.2 % (56/65). Die NPA beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B betrug 88.7 % (63/71), beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C 81.0 % (64/79), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C 88.6 % (70/79), beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser A 96.9 % (63/65), beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser A 98.5 % (64/65) und beim Vergleich zwischen Ableser C und Ableser B 98.6 % (70/71). Die Gesamtübereinstimmungsraten waren für alle Ableser im paarweisen Vergleich ähnlich: 92.6 % (126/136) beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser B, 88.2 % (120/136) beim Vergleich zwischen Ableser A und Ableser C und 92.6 % (126/136) beim Vergleich zwischen Ableser B und Ableser C.

Studien zur Inter-Labor- und Inter-Ableser-Reproduzierbarkeit auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät bei Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit

An der Studie der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit beteiligten sich drei Labore aus verschiedenen Einrichtungen in den USA. Jede Einrichtung erhielt Schnitte von FFPE-Geweben von 28 Fällen eines invasiven Mammakarzinoms [jeweils 7 aus jeder HER2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)] und ein Paar Kontrollobjektträger (einen PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide und einen Mammakarzinomgewebefall als Kontrolle) für jeden von 10 Färbeläufen zur Färbung auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät mit dem empfohlenen Färbeprotokoll und *ultra*View Universal DAB Detection Kit. Als Kontrollen wurden PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, ein Mammakarzinomgewebefall als Kontrolle und ein mit negativem Ig-Reagenz gefärbter, zweiter Objektträger von jedem geprüften Fall verwendet. Die gegenüber dem Fallstatus verblindeten Pathologen vergaben einen klinischen Score zur Bewertung der Objektträger (d. h. 0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse wurden von Ventana ausgewertet.

Die Reproduzierbarkeit des HER2-Status (positiv oder negativ) wurde für alle auswertbaren Fallobjektträger bewertet, wobei der modale HER2-Status auf Fallebene als Referenz für jeden Fall verwendet wurde. Zur Berechnung der Übereinstimmungsraten wurde ein HER2-Score von 0 oder 1+ als negativ und ein HER2-Score von 2+ oder 3+ als positiv betrachtet. Der modale HER2-Status wurde für jeden Fall als das am häufigsten beobachtete Ableser-Ergebnis (positiv oder negativ) für den jeweiligen Fall bestimmt. Alle Beobachtungen, die durch Zusammenfassen aller Einrichtungen, Ableser, Tage und Fälle für alle auswertbaren Fallobjektträger erzielt wurden, wurden mit den Ergebnissen zum modalen HER2-Status verglichen. Die PPA, NPA und OPA der gepoolten Analyse betrugen 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420) bzw. 97.7 % (821/840). Die Reproduzierbarkeit des HER2-Status wurde auch als APA, ANA und OPA für alle möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den Einrichtungen und für alle Vergleiche zwischen Einrichtungen in Kombination geprüft. Die APA, ANA und OPA in Bezug auf die Inter-Einrichtung-Reproduzierbarkeit betrug jeweils 95.9 %. Die APA, ANA und OPA in Bezug auf die Inter-Ableser-Reproduzierbarkeit betrug jeweils 95.5 %. Die APA, ANA und OPA in Bezug auf die Inter-Tage-Reproduzierbarkeit betrug jeweils 97.0 %. Zweiseitige 95 %-KIs wurden unter Verwendung der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 18 bis 21 angegeben.

Tabelle 18. Gepoolte Übereinstimmung des HER2-Status und des modalen Status auf Fallebene von Mammakarzinomfällen nach Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper auf dem BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-Status	Modaler Status auf dem BenchMark ULTRA PLUS		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	411	10	421
Negativ	9	410	419
Gesamt	420	420	840
	n/N	% (95 %-KI)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

Tabelle 19. Gepoolte Übereinstimmungsraten paarweiser Vergleiche des HER2-Status von Mammakarzinomfällen in den Einrichtungen nach Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper auf dem BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-Status in Einrichtung i	HER2-Status in Einrichtung j		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	4037	163	4200
Negativ	183	4017	4200
Gesamt	4220	4180	8400
	n/N	% (95 %-KI)	
Durchschnittl. positive Übereinstimmung	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Durchschnittl. negative Übereinstimmung	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Hinweis: Bei den Einrichtungen i und j handelt es sich um die Einrichtungen, in denen die Studie durchgeführt wurde (Einrichtung A, Einrichtung B und Einrichtung C). Die gepoolte Übereinstimmungsrate wird berechnet, indem alle möglichen Vergleiche zwischen allen Einrichtungen gepoolt werden (Einrichtung A vs. B, A vs. C und B vs. C).

Tabelle 20. Gepoolte Übereinstimmungsraten paarweiser Vergleiche des HER2-Status von Mammakarzinomfällen zwischen Ablesern nach Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper auf dem BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-Status von Ableser 1	HER2-Status von Ableser 2		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	201	9	210
Negativ	10	200	210
Gesamt	211	209	420
	n/N	% (95 %-KI)	
Durchschnittl. positive Übereinstimmung	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Durchschnittl. negative Übereinstimmung	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Hinweis: Bei den Ablesern 1 und 2 handelt es sich um die Ableser aus denselben Einrichtungen, in denen die Studie durchgeführt wurde (Einrichtung A, Einrichtung B und Einrichtung C). Die gepoolte Übereinstimmungsrate wird berechnet, indem die Übereinstimmungen zwischen den Ablesern innerhalb einer Einrichtung über alle Studieneinrichtungen hinweg gepoolt werden.

Tabelle 21. Gepoolte Übereinstimmungsraten paarweiser Vergleiche des HER2-Status von Mammakarzinomfällen zwischen Tagen nach Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper auf dem BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-Status an Tag i	HER2-Status an Tag j		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	817	15	832
Negativ	35	813	848
Gesamt	852	828	1680
	n/N	% (95 %-KI)	
Durchschnittl. positive Übereinstimmung	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Durchschnittl. negative Übereinstimmung	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Hinweis: Die Tage i und j sind die Tage (Tag 1 bis Tag 5), an denen in der Studie eine Färbung durchgeführt wurde. Die gepoolte Übereinstimmungsrate wird berechnet, indem alle möglichen Vergleiche zwischen zwei beliebigen Tagen der Auswertung durch jeden Ableser an jeder Einrichtung gepoolt werden.

Studie zum Vergleich zwischen dem BenchMark ULTRA PLUS und dem BenchMark ULTRA Gerät

Drei Labore von verschiedenen Einrichtungen in den USA nahmen an einer Studie zur Konkordanz zwischen dem BenchMark ULTRA PLUS und dem BenchMark ULTRA Gerät teil. Schnitte von FFPE-Geweben von 122 Fällen mit invasivem Mammakarzinoms aus jeder HER-2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+) wurden von Ventana auf einem BenchMark ULTRA Gerät mit dem empfohlenen Färbeprotokoll und *ultra*View Universal DAB Detection Kit gefärbt. Die Kontrollen bestanden aus einem PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide und einem positiven Mammakarzinomgewebefall je Färbelauf. Zusätzlich wurde jeweils ein zweiter Objektträger jedes getesteten Falls mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt. Schnitte derselben Fälle wurden randomisiert und gleichmäßig auf die Studieneinrichtungen verteilt (40–41 Fälle pro Einrichtung). Die Färbung erfolgte auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät mit dem empfohlenen Färbeprotokoll und *ultra*View Universal DAB Detection Kit. Die Kontrollen bestanden aus einem PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide und einem positiven Mammakarzinomgewebefall je Färbelauf. Zusätzlich wurde jeweils ein zweiter Objektträger jedes getesteten Falls mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt. Die gegenüber dem Fallstatus verblindeten Pathologen bewerteten die auf einem BenchMark IHC/ISH Gerät gefärbten Objektträger und vergaben einen klinischen Score (d. h. 0, 1+, 2+, 3+). Nach einer zweiwöchigen Auswaschphase bewerteten die Pathologen die Objektträger, die auf dem zweiten BenchMark IHC/ISH Gerät gefärbt wurden. Die Ergebnisse wurden von Ventana ausgewertet. Ein HER2-Score von IHC 0+ oder 1+ wurde als negativ und ein HER2-Score von IHC 2+ oder 3+ als positiv betrachtet. Die OPA, PPA und NPA betrugen 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) bzw. 89.1 % (179/201). Die zweiseitigen 95 %-KIs wurden unter Verwendung der Perzentil-Bootstrap-Methode berechnet. Die Raten der Akzeptanz für Hintergrund und Morphologie betrugen in allen Fällen für beide Geräte 100 %. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 22 angegeben.

Tabelle 22. Gepoolte Übereinstimmung des HER2-Status von Mammakarzinomfällen nach Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät und auf dem BenchMark ULTRA Gerät.

HER2-Status, BenchMark ULTRA PLUS	HER2-Status, BenchMark ULTRA		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	154	22	176
Negativ	11	179	190
Gesamt	165	201	366
	n/N	**% (95 %-KI)**	
Positive prozentuale Übereinstimmung	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

Analytische Leistung bei Magenkrebsfällen

Studien zur Präzision auf dem BenchMark ULTRA und dem BenchMark XT Gerät:

Zur Bestimmung der Inter-Lauf-Wiederholpräzision auf dem BenchMark XT Gerät wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen (nicht aufeinanderfolgend) in fünf Läufen durchgeführt. Fünf Objektträger, die drei Magengewebefälle mit HER2-Expressionsscores von 0, 1+, 2+ und 3+ enthielten, zeigten 100 % Übereinstimmung innerhalb des positiven/negativen Werts für jedes Gewebe.

Zur Bestimmung der Intra-Lauf-Wiederholpräzision auf dem BenchMark XT Gerät wurden 28 Objektträger mit drei Magengewebefällen mit HER2-Expressionsscores von 0, 1+, 2+ und 3+ verwendet. Alle Fälle wurden innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Die Intra-Plattform-Wiederholpräzision wurde auf drei BenchMark XT Geräten bestimmt. In diesen Läufen wurden alle 30 Objektträger von jedem der zwei verschiedenen Multigewebeblöcke, die drei Magengewebefälle mit HER2-Expressionswerten von 0, 1+, 2+ und 3+ enthielten, innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Die Intra-Plattform-Wiederholpräzision wurde auf drei BenchMark ULTRA Geräten bestimmt. In diesen Läufen wurden alle 15 Objektträger eines Multigewebeblocks innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Die Inter-Plattform-Wiederholpräzision wurde auf drei BenchMark XT und drei BenchMark ULTRA Geräten untersucht. In diesen Läufen wurden alle 30 Objektträger eines Multigewebeblocks innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Vergleich zwischen *i*VIEW DAB Detection Kit und *ultra*View Universal DAB Detection Kit bei Magenkrebsfällen

Für einen Vergleich von Nachweiskits zwischen zwei Geräten (BenchMark XT und BenchMark ULTRA Gerät) wurden Klon 4B5 sowie *i*VIEW DAB Detection Kit und *ultra*View Universal DAB Detection Kit verwendet. Für den Test wurden 210 Gewebefälle verwendet. Die gefärbten Objektträger wurden hinsichtlich der klinischen Scores (positiv/negativ) bewertet.

Die Rate der morphologischen Akzeptanz und die Rate der Hintergrundakzeptanz betrugen mit beiden Nachweiskits und Geräten jeweils 100 %. In den folgenden Tabellen sind Direktvergleiche für positive und negative klinische Bewertungen zwischen Nachweiskits für jedes Gerät aufgeführt.

Tabelle 23. Klinische Beurteilung bei Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit vs. *i*VIEW DAB Detection Kit auf dem BenchMark XT Gerät.

*ultra*View Universal DAB Detection Kit	*i*VIEW DAB Detection Kit		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	21	0	21
Negativ	0	189	189
Gesamt	21	189	210
	n/N	**%**	
Positive prozentuale Übereinstimmung	21/21	100	

*ultra*View Universal DAB Detection Kit	*i*VIEW DAB Detection Kit		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Negative prozentuale Übereinstimmung	189/189	100	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	210/210	100	

Tabelle 24. Vergleich der klinischen Beurteilung bei Verwendung eines BenchMark XT und eines BenchMark ULTRA Geräts und *ultra*View Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	20	1	21
Negativ	0	189	189
Gesamt	20	190	210
	n/N	% (95 %-KI)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	20/20	100 (83.9-100)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bei Verwendung von Klon 4B5 bei Magenkarzinom:

Die Studie wurde in drei Prüfeinrichtungen durchgeführt. Die Auswahl der Proben für die Studie erfolgte auf der Grundlage des klinischen Scores nach IHC mit Klon 4B5 derart, dass es ungefähr die gleiche Anzahl positiver (3+) und negativer (0, 1+) Fälle gab. Zusätzlich wurden bis zu vier geeignete Magenkrebsfälle mit dem Score 2+ untersucht.

Die drei Einrichtungen verwendeten jeweils ein BenchMark XT und ein BenchMark ULTRA Gerät, um vier Färbeläufe pro Gerät durchzuführen. Die Fälle wurden nach einem stratifizierten Verfahren für die Färbung randomisiert, so dass in jedem Durchlauf Fälle enthalten waren, die alle Kategorien der Beurteilung auf HER2 bei Magenkrebs repräsentierten. Die Läufe auf jedem Gerät in jeder Einrichtung wurden jeweils mit denselben Fällen durchgeführt. In jeder Einrichtung wurde ein Objektträger jedes Falls mit Klon 4B5 gefärbt, und ein weiterer Objektträger desselben Falls wurde mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig auf dem BenchMark ULTRA Gerät gefärbt. Außerdem wurde in jeder Einrichtung ein zweites Objektträgerpaar aus demselben Fall auf ähnliche Weise auf dem BenchMark XT Gerät gefärbt. Die Objektträger der Fälle wurden in jeder Einrichtung von einem qualifizierten Ableser bewertet, der gegenüber den vorhandenen klinischen IHC-Scores für jede Probe verblindet war.

Die Gesamtübereinstimmung bei allen auswertbaren Fällen im Vergleich zwischen allen drei Einrichtungen betrug sowohl auf dem BenchMark ULTRA Gerät als auch auf dem BenchMark XT Gerät jeweils 100 %. Die Gesamtübereinstimmung zwischen dem BenchMark ULTRA Gerät und dem BenchMark XT Gerät bei auswertbaren Fällen betrug in jeder der drei Einrichtungen 100 %. Die Raten der Akzeptanz für Hintergrund und Morphologie betrugen für beide Geräte in den Einrichtungen A und C 100 % und für beide Geräte in der Einrichtung B > 95 % (siehe nachstehende Tabellen).

Tabelle 25. Gesamtübereinstimmung der klinischen Beurteilung zwischen den Einrichtungen: Magenkarzinom, alle auswertbaren Fälle.

BenchMark ULTRA Gerät	Prozentuale Gesamtübereinstimmung
Einrichtung A vs. Einrichtung B: n/N (%) (95 %-KI)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
Einrichtung A vs. Einrichtung C: n/N (%) (95 %-KI)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
Einrichtung B vs. Einrichtung C: n/N (%) (95 %-KI)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
BenchMark XT Gerät	**Prozentuale Gesamtübereinstimmung**
Einrichtung A vs. Einrichtung B: n/N (%) (95 %-KI)	31/31 (100 %) (89.0 – 100,0)
Einrichtung A vs. Einrichtung C: n/N (%) (95 %-KI)	31/31 (100 %) (89.0 – 100,0)
Einrichtung B vs. Einrichtung C: n/N (%) (95 %-KI)	31/31 (100 %) (89.0 – 100,0)

Tabelle 26. Gesamtübereinstimmung der klinischen Beurteilung zwischen Plattformen: Magenkarzinom, alle auswertbaren Fälle.

BenchMark ULTRA Gerät vs BenchMark XT Gerät	Prozentuale Gesamtübereinstimmung
Einrichtung A: n/N (%) (95 %-KI)	40/40 (100 %) (91.2 – 100)
Einrichtung B: n/N (%) (95 %-KI)	34/34 (100 %) (89.8 – 100)
Einrichtung C: n/N (%) (95 % KI)	32/32 (100 %) (89.3 – 100)

Tabelle 27. Raten der Akzeptanz der Hintergrundfärbung und Morphologie: Magenkarzinom, alle Fälle.

BenchMark ULTRA Gerät	Einrichtung A	Einrichtung B	Einrichtung C
Akzeptanzraten der Morphologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Akzeptanzraten der Hintergrundfärbung	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
BenchMark XT Gerät	**Einrichtung A**	**Einrichtung B**	**Einrichtung C**
Akzeptanzraten der Morphologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Akzeptanzraten der Hintergrundfärbung	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

Studie zum Vergleich zwischen dem BenchMark Gerät, dem BenchMark GX Gerät und dem BenchMark XT Gerät: Magenkarzinom

Schnitte von 3 TMAs mit FFPE-Gewebe von Magenkarzinomfällen [ungefähr 50 Fälle je TMA] wurden unter Verwendung der jeweils empfohlenen Färbeprotokolle für *ultra*View Universal DAB Detection Kit und *i*VIEW DAB Detection Kit auf einem BenchMark XT Gerät, einem BenchMark Gerät und einem BenchMark GX Gerät gefärbt. Als Kontrollen wurden PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und ein mit negativem Ig-Reagenz gefärbter, zweiter Objektträger von jedem TMA verwendet. Die gefärbten Objektträger wurden von einem Ableser (Pathologen) bewertet.

Die Gesamtübereinstimmungsraten (und die Untergrenze des zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalls) bei Durchführung der Färbung mit dem Antikörper von Klon 4B5 basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrugen: BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 98.0 % (94.2–99.3), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 97.4 % (93.6–99.0), BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 96.6 % (92.7–98.4), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 95.9 % (91.8–98.0).

Die Raten der Übereinstimmungen der positiven Befunde (und die Untergrenze des zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalls) bei Durchführung der Färbung mit dem Antikörper von Klon 4B5 basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrugen:

BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 91.7 % (64.4–98.5), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 78.6 % (52.4–92.4), BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 80.0 % (54.8–93.0), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 73.3 % (48.0–89.1).

Die Raten der Übereinstimmungen der negativen Befunde (und die Untergrenze des zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalls) bei Durchführung der Färbung mit Klon 4B5 basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ) betrugen: BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8–99.6), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1–99.9), BenchMark Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 98.1 % (94.6–99.4), BenchMark GX Gerät vs. BenchMark XT Gerät mit *i*VIEW DAB Detection Kit 98.1 % (94.5–99.3). Die nachstehenden Tabellen enthalten 2x2-Darstellungen der Übereinstimmungsraten für jeden Vergleich basierend auf der klinischen Beurteilung (positiv, negativ).

Tabelle 28. 2x2-Analyse der Raten der Inter-Plattform-Übereinstimmung beim Vergleich zwischen dem BenchMark Gerät und dem BenchMark XT Gerät bei Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit: Magenkarzinom.

Klon 4B5 mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit			
	BenchMark XT Gerät		
BenchMark Gerät	**Positiv**	**Negativ**	**Gesamt**
Positiv	11	2	13
Negativ	1	133	134
Gesamt	12	135	147
	n/N	**% (95 %-KI)**	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	144/147	98.0 % (94.2–99.3)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	11/12	91.7 % (64.6–98.5)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	133/135	98.5 % (94.8–99.6)	

Tabelle 29. 2x2-Analyse der Raten der Inter-Plattform-Übereinstimmung beim Vergleich zwischen dem BenchMark GX Gerät und dem BenchMark XT Gerät bei Verwendung von *ultra*View Universal DAB Detection Kit: Magenkarzinom.

Klon 4B5 mit *ultra*View Universal DAB Detection Kit			
	BenchMark XT Gerät		
BenchMark GX Gerät	**Positiv**	**Negativ**	**Gesamt**
Positiv	11	1	12
Negativ	3	140	143
Gesamt	14	141	155
	n/N	**% (95 %-KI)**	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	151/155	97.4 % (93.6–99.0)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	11/14	78.6 % (52.4–92.4)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	140/141	99.3 % (96.1–99.9)	

Tabelle 30. 2x2-Analyse der Raten der Inter-Plattform-Übereinstimmung beim Vergleich zwischen dem BenchMark Gerät und dem BenchMark XT Gerät bei Verwendung von *i*VIEW DAB Detection Kit: Magenkarzinom.

Klon 4B5 mit *i*VIEW DAB Detection Kit			
	BenchMark XT Gerät		
BenchMark Gerät	**Positiv**	**Negativ**	**Gesamt**
Positiv	12	3	15
Negativ	3	156	159
Gesamt	15	159	174
	n/N	**% (95 %-KI)**	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	168/174	96.6 % (92.7–98.4)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	12/15	80.0 % (54.8–93.0)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	156/159	98.1 % (94.6–99.4)	

Tabelle 31. 2x2-Analyse der Raten der Inter-Plattform-Übereinstimmung beim Vergleich zwischen dem BenchMark GX Gerät und dem BenchMark XT Gerät bei Verwendung von *i*VIEW DAB Detection Kit: Magenkarzinom.

Klon 4B5 mit *i*VIEW DAB Detection Kit			
	BenchMark XT Gerät		
BenchMark GX Gerät	**Positiv**	**Negativ**	**Gesamt**
Positiv	11	3	14
Negativ	4	154	158
Gesamt	15	157	172
	n/N	**% (95 %-KI)**	
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	165/172	95.9 % (91.8–98.0)	
Positive prozentuale Übereinstimmung	11/15	73.3 % (48.0–89.1)	
Negative prozentuale Übereinstimmung	154/157	98.1 % (94.5–99.3)	

Studien zur Präzision auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät

Zur Bestimmung der Intra-Lauf-Wiederholpräzision auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät wurden 120 Objektträger von 24 Magengewebefällen mit HER2-Expressionsscores von 0, 1+, 2+ und 3+ verwendet. Alle Fälle wurden innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Zur Bestimmung der Inter-Lauf-Wiederholpräzision auf dem BenchMark ULTRA PLUS Gerät wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen (nicht aufeinanderfolgend) fünf Läufe durchgeführt, was 240 Objektträgern von 24 Magengewebefällen mit HER2-Expressionsscores von 0, 1+, 2+ und 3+ entspricht. Alle Fälle wurden innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Die Intra-Plattform-Wiederholpräzision wurde auf drei BenchMark ULTRA PLUS Geräten bestimmt. Bei diesen Läufen wurden 144 Objektträger von 24 Magengewebefällen mit HER2-Expressionsscores von 0, 1+, 2+ und 3+ verwendet. Alle Fälle wurden innerhalb des positiven/negativen Werts für jeden Gewebetyp gleich bewertet.

Ergebnisse zur Konkordanz zwischen dem BenchMark ULTRA PLUS und dem BenchMark ULTRA Gerät

Schnitte von FFPE-Gewebe von 94 Magenkarzinomfällen wurden auf einem BenchMark ULTRA PLUS Gerät und einem BenchMark ULTRA Gerät unter Verwendung der jeweils empfohlenen Färbeprotokolle für *ultra*View Universal DAB Detection Kit gefärbt. Als Kontrollen wurden bei jedem Färbelauf ein HER2-positiver Magenkarzinom-Fall sowie ein mit einem negativem Ig-Reagenz gefärbter zweiter Testobjektträger verwendet. Die gefärbten Objektträger wurden von einem Ableser (Pathologen) bewertet.

Die Gesamtübereinstimmungsraten bei Färbung mit dem anti-HER2 (4B5) Antikörper bezogen auf den Status (positiv, negativ) betrug 98.9 %. Die Rate der Übereinstimmung der positiven Befunde betrug 100.0 % und der negativen Befunde 98.4 %. Die zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervalle wurden mit der Wilson-Score-Methode berechnet. Die Raten der Akzeptanz für Hintergrund und Morphologie betrugen in allen Fällen für beide Geräte 100 %.

KLINISCHE LEISTUNG

Studien zum Vergleich zwischen dem monoklonalen Kaninchen-Antikörper 4B5 und PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody bei Brustkrebs

In einer Methodenvergleichsstudie wurde die Korrelation zwischen Klon 4B5 und PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper) bzw. PathVysion HER2 FISH (bei beiden handelt es sich um von der FDA zugelassene diagnostische Tests) untersucht. An der Studie beteiligten sich sechs Pathologen. Zwei Gruppen mit je drei Pathologen bewerteten zwei unabhängige Kohorten (Kohorte 1: n = 178, Kohorte 2: n = 144) von Fällen mit bekanntem Brustkrebs, die mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper und Klon 4B5 gefärbt waren. Die FISH-Daten stammten aus der Vorgeschichte der Patienten. Für jeden Fall wurde ein Konsens-Score der drei Ableser für jeden Antikörper erstellt, um die bei der HER2-Bewertung bekanntermaßen vorhandene Intraobserver-Variabilität zu reduzieren.[34,35,36] Insgesamt wurden 322 Fälle bewertet. Die Vorbehandlung und Färbung der mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper gefärbten Objektträger erfolgten unter Einhaltung der Herstelleranweisungen im Methodenblatt für den PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper. Zwischen der Färbung und dem Ablesen der mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper gefärbten Objektträger lag durchschnittlich etwa ein Jahr. Da die Scores eines der sechs Ableser außerhalb des Konfidenzintervalls (KI) lagen, stellen sich die Daten der beiden Kohorten wie folgt dar:

Inter-Pathologen-Reproduzierbarkeit der Proben in der Vergleichsstudie

Tabelle 32. Kohorte 1: IHC-Konsenswerte von drei Pathologen.

Score bei Verwendung von Klon 4B5	Score bei Verwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers			
	3+	2+	0, 1+	Gesamt
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Gesamt	31	37	75	143

Kohorte 1: Leistungsmerkmale in der 3x3-Darstellung.

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (29+13+53)/143 = 66.4 % (95 %-KI = 38.6 %, 59.7 %).

Kohorte 1: Leistungsmerkmale in der 2x2-Darstellung (positive (2+ und 3+) und negative (0 und 1+) Scores bei Verwendung des HER-2 Antikörpers sind kombiniert).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (29+2+24+13)/(31+37) = 100 % (95 %-KI = 97.5 % – 100 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 53/75 = 70.7 % (95 %-KI = 58.5 % – 80.1 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (29+24+2+13+53)/143 = 84.7 % (95 %-KI = 78.2 % – 90.0).

Tabelle 33. Kohorte 2: IHC-Konsenswerte von drei Pathologen.

Score bei Verwendung von Klon 4B5	Score bei Verwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers			
	3+	2+	0, 1+	Gesamt
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Gesamt	73	20	85	178

Kohorte 2: Leistungsmerkmale in der 3x3-Darstellung.

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (72+12+80)/178 = 92.1 % (95 %-KI = 80.1 %, 93.1 %).

Kohorte 2: Leistungsmerkmale in der 2x2-Darstellung (positive (2+ und 3+) und negative (0 und 1+) Scores bei Verwendung des HER2 Antikörpers sind kombiniert).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (72+12+1+1)/(73+20) = 92.5 % (95 %-KI = 85.2 % – 96.9 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 80/85 = 94.1 % (95 %-KI = 86.8 % – 98.1 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (72+12+1+1+80)/178 = 93.3 % (95 %-KI = 88.5 % – 96.4 %).

Tabelle 34. Kohorte 1: IHC-Konsenswerte der drei Pathologen mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper verglichen mit FISH.

Score bei Verwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Gesamt	86	58	144

Kohorte 1: Leistungsmerkmale für die IHC mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper und FISH, 2x2-Darstellung (wobei die Scores 2 und 3 als positiv gelten).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (32+32)/86 = 74.4 % (95 %-KI = 63.8 % – 83.2 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 53/58 = 91.4 % (95 %-KI = 80.9 % – 97.1 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (32+32+53)/144 = 81.2 % (95 %-KI = 73.9 % – 87.2 %).

Tabelle 35. Kohorte 1: IHC-Konsenswerte mit Klon von drei Pathologen 4B5 im Vergleich zu FISH.

Score bei Verwendung von Klon 4B5	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Gesamt	86	58	144

Kohorte 1: Leistungsmerkmale für Klon 4B5 und FISH, 2x2-Darstellung (wobei Score 2 und 3 als positiv gelten).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (55+25)/86 = 93.0 % (95 %-KI = 87.9 % – 96.3 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 47/58 = 81.0 % (95 %-KI = 73.4 % – 86.0 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (55+25+47)/144 = 88.2 % (95 %-KI = 82.1 % – 92.2 %).

Tabelle 36. Kohorte 2: IHC-Konsenswerte der drei Pathologen mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper verglichen mit FISH.

Score bei Verwendung des PATHWAY HER2 (CB11) Antikörpers	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Gesamt	93	85	178

Kohorte 2: Leistungsmerkmale für die IHC mit dem PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper und FISH, 2x2-Darstellung (wobei die Scores 2 und 3 als positiv gelten).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (72+13)/93 = 91.3 % (95 %-KI = 85.0 % – 96.7 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 77/85 = 90.6 % (95 %-KI = 83.9 % – 96.3 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (72+13+77)/178 = 91.0 % (95 %-KI = 86.5 % – 94.9 %).

Tabelle 37. Kohorte 2: IHC-Konsenswerte mit Klon von drei Pathologen 4B5 im Vergleich zu FISH.

Score bei Verwendung von Klon 4B5	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Gesamt	93	85	178

Kohorte 2: Leistungsmerkmale für Klon 4B5 und FISH, 2x2-Darstellung (wobei Score 2 und 3 als positiv gelten).

- Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt (72+11)/93 = 89.2 % (95 %-KI = 82.5 % – 95.1 %).
- Die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt 77/85 = 90.6 % (95 %-KI = 84.0 % – 96.4 %).

Die Gesamtübereinstimmung beträgt (72+11+77)/178 = 90.0 % (95 %-KI = 85.4 % – 93.6 %).

Inter-Pathologen-Reproduzierbarkeit der Proben in der Vergleichsstudie

Es ist bekannt, dass Immunhistochemie-Objektträger von unterschiedlichen Pathologen gegebenenfalls auch unterschiedlich interpretiert werden. Daher wurden alle Proben in jeder der beiden Kohorten von jeweils drei Pathologen bewertet (d. h. von insgesamt 6 Pathologen). Zur Bewertung der Endergebnisse wurde eine Zwei-aus-Drei-Regel angewendet. Die von den drei Pathologen in der Vergleichsstudie für die Proben in jeder Kohorte jeweils erhaltenen Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst.

Tabelle 38. Kohorte 1: Bewertung der drei Pathologen bei Anwendung von Klon 4B5.

HER2 Score	Score bei Verwendung von Klon 4B5		
	Pathologe 1	Pathologe 2	Pathologe 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Gesamt	174	178	178

Hinweis: Insgesamt 3 Proben variierten bei der Bewertung des Färbeergebnisses durch die drei Pathologen um mehr als eine Bewertungskategorie (d. h. 0, 2+).

Probe 1: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 2+, zwei Pathologen als 0.

Probe 2: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, zwei Pathologen als 2+.

Probe 3: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 1+ und der dritte Pathologe als 2+.

Tabelle 39. Kohorte 1: IHC-Bewertung der drei Pathologen bei Anwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers.

HER2 Score	Score bei Verwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers		
	Pathologe 1	Pathologe 2	Pathologe 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Gesamt	174	178	178

Hinweis: Insgesamt 1 Probe variierte bei der Bewertung des Färbeergebnisses durch die drei Pathologen um mehr als eine Bewertungskategorie (d. h. 1 bis 3+).

Probe 1: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 1+, ein Pathologe als 2+ und der dritte Pathologe als 3+.

Tabelle 40. Kohorte 2: Bewertung der drei Pathologen bei Anwendung von Klon 4B5.

HER2 Score	Score bei Verwendung von Klon 4B5		
	Pathologe 4	Pathologe 5	Pathologe 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Gesamt	141	144	144

Hinweis: Insgesamt 6 Proben variierten bei der Bewertung des Färbeergebnisses durch die drei Pathologen um mehr als eine Bewertungskategorie (z. B. 0, 3+).

Probe 1: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 0 und der dritte Pathologe als 2+.

Probe 2: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 1+, ein Pathologe als 1+ und der dritte Pathologe als 3+.

Probe 3: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 2+ und der dritte Pathologe als 2+.

Proben 4 und 5: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 2+ und der dritte Pathologe als 2+.

Probe 6: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 3+ und der dritte Pathologe als 3+.

Tabelle 41. Kohorte 2: IHC-Bewertung der drei Pathologen bei Anwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers.

HER2 Score	Score bei Verwendung des PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörpers		
	Pathologe 4	Pathologe 5	Pathologe 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Gesamt	144	144	144

Hinweis: Insgesamt 8 Proben variierten bei der Bewertung des Färbeergebnisses durch die drei Pathologen um mehr als eine Bewertungskategorie (d. h. 0 bis 2+).

Proben 1 bis 6: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 1+ und der dritte Pathologe als 2+.

Proben 7 und 8: Ein Pathologe bewertete das Färbeergebnis als 0, ein Pathologe als 2+ und der dritte Pathologe als 2+.

Nachstehend sind die Bereiche der prozentualen Übereinstimmungen zwischen Pathologen im paarweisen Vergleich tabellarisch dargestellt (drei Paare für jede Kohorte).

Tabelle 42. Bereiche der 2x2*-Übereinstimmungen zwischen den drei Pathologen.

	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung	Positive prozentuale Übereinstimmung	Negative prozentuale Übereinstimmung
Klon 4B5 vs. PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper			
Kohorte 1	82.6 – 86.9 %	97.3 – 100.0 %	68.0 % – 75.4 %
Kohorte 2	88.2 – 95.5 %	87.6 – 95.6 %	86.1 – 95.4 %
Klon 4B5 vs. FISH			
Kohorte 1	86.8 – 88.2 %	90.7 – 94.2 %	79.3 – 81.0 %
Kohorte 2	87.4 – 89.9 %	88.2 – 90.0 %	84.5 – 91.8 %
PATHWAY anti-HER2 (CB11) Antikörper vs. FISH			
Kohorte 1	79.9 – 84.0 %	73.3 – 80.2 %	89.7 – 89.7 %
Kohorte 2	84.8 % – 93.3 %	86.7 – 92.5 %	82.7 – 94.1 %

* 0, 1+ = negativ. 2+ und 3+ = positiv.

Fazit: Diese Studie zeigt eine klinisch bedeutsame Konkordanz (Gesamtübereinstimmung zwischen positiven/negativen Ergebnissen) zwischen dem Assay mit dem Klon 4B5 und dem Assay mit PATHWAY anti-HER2 (CB11). Demnach ist der HER2-Antikörper-Klon 4B5 eine akzeptable Alternative zu dem Antikörper CB11 zur Unterstützung der Beurteilung von Patienten mit Mammakarzinom, bei denen eine Therapie mit Trastuzumab (Herceptin) in Betracht kommt. Wie in dieser Studie gezeigt wurde, sind die Ergebnisse der IHC mit 4B5 in Bezug auf die Expression von HER2 mit den mittels FISH-Analyse erzielten Ergebnissen zum HER2-Genstatus vergleichbar.

Vergleich zwischen Klon 4B5 und HercepTest bei Magenkrebs:

In einer verblindeten externen Studie wurde die Färbeleistung von Klon 4B5 auf dem BenchMark XT Gerät mit der von Dako HercepTest verglichen. Es wurden zwei Kohorten von Proben untersucht: (1) neu zusammengestellte Gewebe-Mikroarrays (TMAs) mit 248 Magenkrebsfällen (sechs Fälle erwiesen sich später als Duplikate und wurden entfernt) und (2) eine Untergruppe von 183 Proben aus der klinischen Studie ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer), in welcher der HER2-Status und das klinische Ergebnis bei mit Herceptin (Trastuzumab) behandelten Patienten untersucht wurden. Die Fälle wurden im Labor mit Klon 4B5 und HercepTest gefärbt. Für den Vergleich wurden insgesamt 431 Fälle berücksichtigt, bei denen beide Assays auswertbar waren. Ein Pathologe bewertete die Fälle als 0/1+, 2+ oder 3+. Die Scores 2+ und 3+ wurden für positive Fälle vergeben, die Scores 0 und 1+ für negative Fälle. Tabelle 43 zeigt die Raten der Übereinstimmung zwischen Klon 4B5 und HercepTest in beiden untersuchten Kohorten.

Tabelle 43. Daten zur Übereinstimmung zwischen Klon 4B5 (IHC) und HercepTest bei Magenkarzinom.

Gewebequelle	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung (95 %-KI)	Positive prozentuale Übereinstimmung (95 %-KI)	Negative prozentuale Übereinstimmung (95 %-KI)
TMA[a] und 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-Ergebnisse wurden als Antikörper-positiv (2+ und 3+) oder -negativ (0+ und 1+) eingestuft.

[a] TMAs: Gewebemikroarray-Proben

[b] ToGA: Proben aus der klinischen Studie ToGA

Methodenvergleich mit dem für die Aufnahme in Studien mit PERJETA (Pertuzumab) und KADCYLA (Trastuzumab-Emtansin) bei Mammakarzinom verwendeten Assay

Die Äquivalenz mit für die Aufnahme von Kohorten in Studien mit PERJETA und KADCYLA verwendeten Assays wurde durch Färbung von Studienproben mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper bestimmt. Es wurden 2753 für eine Studie mit PERJETA beurteilte Proben und 99 für eine Studie mit KADCYLA beurteilte Proben mit dem VENTANA anti-HER2 (4B5) Antikörper gefärbt. und die Übereinstimmungsraten (PPA, NPA und OPA) bestimmt. Das 95 %-KI (2-seitiges 95 %-Konfidenzintervall) wurde mithilfe der Score-Methode berechnet.

Tabelle 44. Übereinstimmung des HER2-Status bei Verwendung von Klon 4B5 und des Dako Assays bei allen hinsichtlich des HER2-Ergebnisses beurteilbaren Individuen. Hinsichtlich des IHC-Ergebnisses beurteilbare Individuen weisen einen sowohl nach Färbung mit Klon 4B5 als auch nach Färbung mit dem für die Studienaufnahme verwendeten IHC-Assay bestimmten positiven oder negativen HER2-Status auf.

		Status bei Färbung mit Dako HER2 [a,b]		
Studie	Score bei Färbung mit Klon 4B5 [b]	Positiv	Negativ	Gesamt
PERJETA und KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Gesamt	2558	272	2830
	Positive prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	2380/2558 (93.0) (92.0–94.0)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	257/272 (94.5) (91.1–96.6)		
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	2637/2830 (93.2) (92.2–94.1)		

[a] Positiv = IHC-positive und/oder ISH-amplifiziert. Negativ = IHC-negativ und nicht ISH-amplifiziert oder nicht ISH-amplifiziert und nicht IHC-positiv.

[b] IHC: Positiv = 3+; Negativ = 0, 1+ oder 2+.

Tabelle 45. Übereinstimmung des IHC-Status bei Verwendung von Klon 4B5 und des Dako Assays bei allen hinsichtlich des IHC-Ergebnisses beurteilbaren Individuen. Hinsichtlich des IHC-Ergebnisses beurteilbare Individuen weisen einen sowohl nach

Färbung mit Klon 4B5 als auch mit dem für die Studienaufnahme verwendeten IHC-Assay bestimmten positiven oder negativen HER2-Status auf.

		Dako HercepTest-Status [a]		
Studie	**Klon 4B5-Status [a]**	**Positiv**	**Negativ**	**Gesamt**
PERJETA und KADCYLA	Positiv	2330	65	2395
	Negativ	21	414	435
	Gesamt	2351	479	2830
	Positive prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	2330/2351 (99.1) (98.6–99.4)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	414/479 (86.4) (83.1–89.2)		
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	2744/2830 (97.0) (96.3–97.5)		
PERJETA	Positiv	2267	63	2330
	Negativ	10	399	409
	Gesamt	2277	462	2739
	Positive prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	2267/2277 (99.6) (99.2–99.8)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	399/462 (86.4) (82.9–89.2)		
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	2666/2739 (97.3) (96.7–97.9)		
KADCYLA	Positiv	63	2	65
	Negativ	11	15	26
	Gesamt	74	17	91
	Positive prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	63/74 (85.1) (75.3–91.5)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung n/N (%) (95 %-KI)	15/17 (88.2) (65.7–96.7)		
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	78/91 (85.7) (77.1–91.5)		

[a] Positiv = 3+; Negativ = 0, 1+ oder 2+.

Tabelle 46. Übereinstimmung der IHC-Scores bei Verwendung von Klon 4B5 und des Dako Assays bei allen hinsichtlich des IHC-Ergebnisses beurteilbaren Individuen. Hinsichtlich des IHC-Ergebnisses beurteilbare Individuen weisen einen sowohl nach Färbung mit Klon 4B5 als auch nach Färbung mit dem für die Studienaufnahme verwendeten IHC-Assay bestimmten positiven oder negativen HER2-Status auf.

		Dako HercepTest-Score			
Studie	**Score bei Verwendung von Klon 4B5**	**3+**	**2+**	**0/1+**	**Gesamt**
PERJETA und KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Gesamt	2351	325	154	2830
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	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
	Total	2277	312	150	2739
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	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
	Total	74	13	4	91
	Prozentuale Gesamtüberein-stimmung n/N (%) (95 %-KI)	74/91 (81.3) (72.1–88.0)			

Tabelle 47. Färbeakzeptanz mit Klon 4B5. IHC-getestete Individuen. Die IHC-Färbung gilt als akzeptabel, wenn ein gültiger IHC-Score (0, 1+, 2+ oder 3+) bestimmt werden konnte. Gründe für eine inakzeptable Färbung sind unter anderem eine inakzeptable Negativkontrolle, Gewebeverlust, zu wenig Tumorgewebe, inakzeptabler Hintergrund und inakzeptable Morphologie.

Parameter	**PERJETA**	**KADCYLA**	**PERJETA und KADCYLA**
Anzahl der anfänglichen IHC-Tests	2753	99	2852
Anfängliche Färbeakzeptanz n/N (%) (95 %-KI)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Anzahl der IHC-Testwiederholungen	40	0	40

Parameter	PERJETA	KADCYLA	PERJETA und KADCYLA
Abschließende Färbeakzeptanz n/N (%) (95 %-KI)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

FEHLERBEHEBUNG

1. Wenn die positive Kontrolle eine schwächere Färbung als erwartet aufweist, sollten die anderen, im selben Gerätelauf verwendeten positiven Kontrollen überprüft werden, um festzustellen, ob dies auf den primären Antikörper oder eines der üblichen sekundären Reagenzien zurückzuführen ist.
2. Wenn die positive Kontrolle negativ ist, überprüfen, ob der Objektträger das richtige Barcode-Etikett aufweist. Wenn der Objektträger ordnungsgemäß gekennzeichnet ist, die anderen, im selben Gerätelauf verwendeten positiven Kontrollen überprüfen, um festzustellen, ob das Ergebnis auf den primären Antikörper oder eines der üblichen sekundären Reagenzien zurückzuführen ist. Das Gewebe wurde möglicherweise nicht ordnungsgemäß gewonnen, fixiert oder entparaffinisiert. Die korrekten Verfahren zur Gewinnung, Aufbewahrung und Fixierung von Gewebe befolgen.
3. Wenn nicht das gesamte Paraffin entfernt wurde, ist möglicherweise keine Färbung vorhanden. In diesem Fall sollte die Entparaffinisierung wiederholt werden.
4. Wenn die spezifische Antikörperfärbung zu intensiv ist, sollte der Lauf mit einer kürzeren Inkubationsdauer wiederholt werden, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist.
5. Wenn Gewebeschnitte vom Objektträger gewaschen werden, die Objektträger überprüfen, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind.
6. Wenn in unmittelbarer Nähe des Tumorbereichs bei Magenkarzinom eine nukleäre und zytoplasmatische Färbung normaler Schleimhaut vorhanden ist und die Interpretation der Membranfärbung erschwert, kann der Fall mittels ISH getestet werden.
7. Bezüglich der Fehlerbehebung den Abschnitt „Färbeverfahren“ bzw. das Benutzerhandbuch des Geräts beachten oder den zuständige Kundendienst kontaktieren.

LITERATURANGABEN

1. Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
3. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
4. 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.
5. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
6. Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
7. Hudis CA. Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.
8. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.
9. 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.
10. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. Gastrointest Endosc. 2019;90(1):44-54.
11. 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.
12. 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.
13. Herceptin (Trastuzamab) [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.
14. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. Mayo Clin Proc. 1994;69: 57-58.
15. 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.
16. 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.
17. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
18. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2019;380(7):617-628.
19. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(8):1154-1161.
20. 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.
21. DePotter CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. Histopathology. 1989;15:351-362.
22. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
23. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
24. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
25. 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.
26. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
27. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
28. 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.
29. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008:52;797-805.
30. 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.
31. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
32. 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.
33. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
34. 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.

35. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
36. 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.

HINWEIS: In diesem Dokument wird statt einem Komma ein Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet, um die Vorkomma- von den Nachkommastellen zu trennen. Es werden keine Tausendertrennzeichen verwendet.

Eine Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung ist verfügbar auf:

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

Symbole

Ventana verwendet die folgenden Symbole und Zeichen zusätzlich zu den Symbolen und Zeichen gemäß Norm ISO 15223-1 (USA: siehe die Symboldefinition auf dialog.roche.com):

GTIN	Internationale Artikelnummer
UDI	Eindeutige Gerätekennung (UDI)
	Verweist auf den Importeur des medizinischen Produkts in die Europäische Union

VERSIONSVERLAUF

Rev.	Updates
D	Aktualisierungen der folgenden Abschnitte: Verwendungszweck, Zusammenfassung und Erklärung, Klinische Bedeutung, Verfahrensprinzip, Im Lieferumfang enthaltenes Material, Nicht im Lieferumfang enthaltene, aber erforderliche Materialien, Probenvorbereitung, Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen, Qualitätskontrollverfahren, Positive Gewebekontrolle, Auswertung der Färbung / Erwartete Ergebnisse, Analytische Leistung, Literaturangaben. Hinzufügung von BenchMark ULTRA PLUS.

GEISTIGES EIGENTUM

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultra*View und das VENTANA Logo sind Marken von Roche. Alle sonstigen Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc. und Roche Diagnostics International, Inc.

KONTAKTDATEN

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

www.roche.com

CE