

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

**REF** 790-4493

05999570001

**IVD**  50

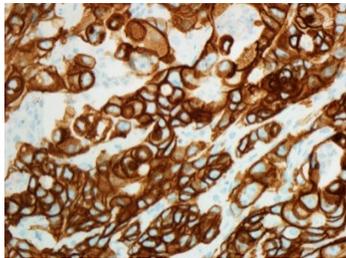


Abbildung 1. VENTANA anti-HER2/neu (4B5) 3+-Färbung bei Magenkrebs

### VERWENDUNGSZWECK

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) ist für den semi-quantitativen Nachweis des HER2-Antigens in normalen und neoplastischen formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Brust- und Magengewebeschnitten in einem VENTANA IHC/ISH-Färbeautomaten bestimmt.

Der Antikörper ist als Hilfsmittel bei der Bewertung von Brust- und

Magenkrebspatienten indiziert, für die eine Herceptin-Behandlung in Betracht gezogen wird, sowie für Brustkrebspatienten, bei denen eine Behandlung mit Kadcyla (Trastuzumab-Emtansine) oder Perjeta (Pertuzumab) in Betracht gezogen wird.

Das Produkt sollte von einem qualifizierten Pathologen in Verbindung mit einer histologischen Untersuchung, klinisch relevanten Informationen und geeigneten Kontrollen interpretiert werden.

Dieser Antikörper ist für die Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

VENTANA HER2 (4B5) ist ein gegen die innere Domäne des c-erbB-2-Onkoproteins (HER2) gerichteter monoklonaler Kaninchen-Antikörper (Klon 4B5). Das c-erbB-2-Onkoprotein wurde im Jahr 1986 von Akiyama et al. geklont und beschrieben.<sup>1</sup> Es handelt sich um ein Transmembran-Glykoprotein von ca. 185 kD, das in seiner Struktur dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) ähnlich ist. Das Protein wird mit einer Tyrosinkinase-Aktivität assoziiert, die der mehrerer Wachstumsfaktor-Rezeptoren und transformierender Proteine der *Src*-Familie ähnelt. Die Kodierungssequenz stimmt mit einer extrazellulären Bindungsdomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne überein. Dies legt den Schluss nahe, dass HER2 an der Signalübertragung und Stimulierung der mitogenen Aktivität beteiligt sein könnte.<sup>1</sup>

Mittels Westernblotting wurde gezeigt, dass der Klon 4B5 mit einem 185-kD-Protein aus SK-BR-3-Zellysaten reagiert. SK-BR-3 ist eine Brustkarzinom-Zelllinie, die über eine 128fache Überexpression der HER2-mRNA verfügt.<sup>2</sup> Die Größe der identifizierten Bande korreliert gut mit der für das HER2-Protein (185 kD) berichteten Bande.<sup>1</sup> Immunhistochemische Experimente mit transfizierten Zelllinien (HEK293) haben gezeigt, dass der Klon 4B5 Zellen färbt, die mit HER2 oder HER4 transfiziert sind. Bei Zellen, die mit HER1 oder HER3 transfiziert waren, wurde keine Färbung beobachtet. Western-Blot-Daten mit rekombinantem HER4-Protein wiesen außerdem darauf hin, dass der Klon 4B5 ein HER4-Epitop erkennt.

Bei Brustkrebs wird das HER2-Protein auf einem Niveau exprimiert, das immunhistochemisch in bis zu 20 % der Adenokarzinome aus verschiedenen Stellen nachweisbar ist. Zwischen 15 bis 30 % der invasiven duktales Krebsarten sind für HER2 positiv.<sup>3</sup> Fast alle Fälle von Pagets-Karzinom der Brust<sup>4</sup> und bis zu 90 % der Fälle von duktales Karzinom *in situ* des Comedo-Typs sind positiv.<sup>3</sup> Bei Magenkrebs wird das HER2-Protein auf einem Niveau exprimiert, das immunhistochemisch in bis zu 30 % der Fälle von intestinalem Typ, 15 % der Fälle von gemischtem Typ und 5 % der Fälle von diffusum Typ nachweisbar ist. Der immunhistochemische Nachweis der HER2-Proteinüberexpression wird zudem als Hilfsmittel bei der Entscheidung herangezogen, ob bei einem Patienten eine auf HER2 abzielende Therapie indiziert ist.<sup>5,31-35</sup>

Die Färbungsergebnisse bei gesundem Gewebe, neoplastischem Gewebe und in 322 Fällen von Brustkrebs mit Klon 4B5 wurden von Ventana ausgewertet. Bei den getesteten normalen Geweben stimmte die Expression mit der Fachliteratur insofern überein, als es keine unerwarteten spezifischen Zytoplasma-/Membranfärbungen gab, mit den folgenden Ausnahmen: zwei Tonsillen-Fälle, die eine Färbung der

Epithelzellmembran zeigten, ein Nebenschilddrüsen-Fall und ein Ösophagusepithel-Fall. Bei den getesteten neoplastischen Geweben wurde in Krebszellen aus Brust, Kolon und Eierstöcken eine Zytoplasma-/Membranfärbung beobachtet. 322 Brustkarzinome wurden mit Klon 4B5 in einer Methodenvergleichsstudie mit PATHWAY HER-2/neu (CB11) ausgewertet. Bezüglich der Färbung gibt es eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Tests. Siehe auch: „Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse“. Zusätzliche Informationen über den Klon 4B5 siehe Literaturangaben.<sup>24-30</sup>

Der Einsatz von vorverdünntem VENTANA HER2 (4B5) und gebrauchsfertigen MIEW DAB Detection Kit und *ultraView* Universal DAB Detection Kit in Kombination mit einem VENTANA IHC/ISH-Färbeautomaten verringert das Risiko menschlichen Versagens und der inhärenten Variabilität, die aufgrund der jeweiligen Reagenzverdünnung sowie aufgrund des Pipettierens und der manuellen Reagenzapplikation entsteht.

### KLINISCHE BEDEUTUNG

Brustkrebs ist bei Frauen das am häufigsten auftretende Karzinom und die zweithäufigste Todesursache im Zusammenhang mit Krebs. In Nordamerika liegt das Risiko, dass eine Frau an Brustkrebs erkrankt, bei 1:8.<sup>6</sup> Früherkennung und geeignete Therapien zur Behandlung können das Gesamtüberleben signifikant beeinflussen.<sup>7</sup> Magenkrebs ist der vierthäufigste Krebs und die zweithäufigste Ursache für Tod durch Krebs weltweit. Eine Operation ist die häufigste Behandlung bei Magenkrebs. Die meisten Magenkrebsfälle werden jedoch erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, und die Ausführung der Operation ist häufig sehr schwierig. Auch wenn die Überlebenschancen der Krebspatienten sehr gering sind, wird Chemotherapie zur Behandlung bei fortgeschrittenem Magenkrebs angewandt. Kleine Gewebeproben können in der Routineimmunhistochemie (IHC) einfach verwendet werden, wodurch diese Technik in Kombination mit Antikörpern, die für die Interpretation von Karzinomen relevante Antigene nachweisen, zu einem effektiven Hilfsmittel für den Pathologen bei der Diagnose und Prognose von Krankheiten wird. Ein wichtiger Marker von Brust- und Magenkrebs ist heute das c-erbB-2-Onkoprotein (HER2).

HER2 ist ein transmembranöses Protein.<sup>8</sup> Es ist eng mit dem EGFR verwandt und zeigt, wie auch der EGFR, Tyrosinkinase-Aktivität.<sup>1</sup> Eine Genamplifikation mit der entsprechenden Überexpression von c-erbB-2 wurde bei verschiedenen Tumoren festgestellt, darunter Mamma- und Magenkarzinomen.<sup>8,9</sup>

Auf HER2 abzielende Therapien haben bei manchen Patienten mit Mamma- oder Magenkarzinom zu Verbesserungen geführt. Lediglich bei Patienten mit HER2-positivem Mamma- oder Magenkarzinom ist zu erwarten, dass sie von einer Behandlung mit HER2 profitieren. *In-vitro*-Diagnostik zur Bestimmung des HER2-Status bei Brust- und Magenkrebs stellt für den Kliniker eine wichtige Hilfe bei der Entscheidung dar, ob bei einem Patient eine auf HER2 abzielende Therapie indiziert ist.

Bei der Interpretation der Ergebnisse eines jeden Nachweissystems für HER2 muss berücksichtigt werden, dass HER2 sowohl bei Mamma- und Magenkarzinomen als auch in gesundem Gewebe exprimiert wird, wenn auch unterschiedlich stark und mit unterschiedlichen Expressionsmustern.<sup>10</sup> Histologische Gewebepreparate haben den Vorteil einer intakten Gewebemorphologie, was bei der Interpretation der HER2-Positivität der Probe hilft.

### VERFAHRENSPRINZIP

VENTANA HER2 (4B5) ist ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper, der an HER2 in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten bindet. Der spezifische Antikörper kann entweder durch eine Biotin-konjugierte Formulierung aus sekundären Antikörpern, die Kaninchen-Immunglobuline erkennt, und anschließender Zugabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat (MIEW DAB Detection Kit) oder durch ein sekundäres Antikörper-HRP-Konjugat lokalisiert werden (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). Der spezifische Antikörper-Enzym-Komplex wird dann mit einem präzipitierten Enzymreaktionsprodukt sichtbar gemacht. Bei jedem Schritt wird mit genau festgelegten Zeiträumen und Temperaturen bebrütet. Am Ende eines jeden Inkubationsschrittes werden die Schnitte mit dem VENTANA IHC/ISH-Färbeautomaten gespült, um die Reaktion zu stoppen und ungebundenes Material zu entfernen, das andernfalls in den folgenden Schritten den Eintritt der gewünschten Farbreaktion verhindern könnte. Er wendet auch Liquid Coverslip an, das die Verdampfung der wässrigen Reagenzien vom Probenobjektträger minimiert.

Klinische Fälle sollten im Rahmen angemessener Kontrollen bewertet werden. Ventana empfiehlt zusätzlich eine positive Gewebekontrolle, die in derselben Art und Weise fixiert und bearbeitet wird wie die Patientenprobe (beispielsweise eines schwach positiven Mamma- oder Magenkarzinoms). Zusätzlich zur Färbung mit VENTANA HER2 (4B5) sollte ein zweites Präparat 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 Komponenten sollten bei einer Färbung mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig negativ ausfallen. Außerdem empfiehlt es sich, einen Kontrollobjektträger mit negativem Gewebe (zum Beispiel eines HER2-negativen Mamma- oder Magenkarzinoms) für jeden verarbeiteten Probenstapel und Durchlauf im VENTANA IHC/ISH-Färbearautomaten einzubeziehen. Dieses negative Kontrollgewebe sollte mit VENTANA HER2 (4B5) gefärbt werden, um sicherzustellen, dass die Antigenaufbereitung und andere Vorbehandlungsmaßnahmen keine falsch positiven Färbungen bewirkt haben.

### IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE REAGENZIEN

VENTANA HER2 (4B5) Der Spender enthält ausreichend Reagenz für 50 Tests.

Ein 5-ml-Spender VENTANA HER2 (4B5) enthält ca. 30 µg eines gegen das menschliche c-erbB-2-Antigen gerichteten monoklonalen Kaninchen-Antikörpers.

Der Antikörper wird mit 0,05 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung, 0,01 M EDTA, 0,05 % Brij-35 mit 0,3 % Trägerprotein und 0,05 % Natriumazid, einem Konservierungsstoff, verdünnt. Es finden sich Spuren fetalen Kälberserums, etwa 0,25 %, aus der Stammlösung.

Die Gesamtproteinkonzentration des Reagenzes beträgt ca. 16 mg/ml. Die spezifische Antikörperkonzentration beträgt ca. 6 µg/ml. VENTANA HER2 (4B5) ist ein aus Gewebekulturrüberstand gelöstes Kaninchen-IgG.

Ausführliche Angaben sind in der entsprechenden Packungsbeilage des VENTANA-Detektionskits erhältlich: (1) Prinzipien des Verfahrens, (2) Nicht im Lieferumfang enthaltene erforderliche Materialien und Reagenzien, (3) Entnahme und Vorbereitung der Proben zur Analyse, (4) Verfahren zur Qualitätskontrolle, (5) Fehlerbehebung, (6) Interpretation der Ergebnisse und (7) Allgemeine Einschränkungen.

### ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN

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

Möglicherweise sind nicht alle in der Packungsbeilage aufgeführten Produkte in allen Regionen verfügbar. Wenden Sie sich an den zuständigen Kundendienstvertreter.

### LAGERUNG

Bei 2 – 8 °C lagern. Nicht einfrieren.

Um die ordnungsgemäße Abgabe der Reagenzien und die Stabilität des Antikörpers zu erhalten, nach Gebrauch Spender-Verschlusskappe wieder aufsetzen und den Spender sofort in aufrechter Position in den Kühlschrank stellen.

Jeder Antikörper-Spender ist mit einem Verfallsdatum versehen. Bei ordnungsgemäßer Aufbewahrung ist das Reagenz bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Das Reagenz nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.

### PROBENPRÄPARATION

Entsprechend der Laborroutinemethode aufgearbeitete, formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeprobe sind zur Verwendung mit diesem primären Antikörper geeignet, wenn sie in Verbindung mit VENTANA-Detektionskits und den VENTANA BenchMark-, BenchMark GX-, BenchMark XT- und BenchMark ULTRA-Färbearautomaten eingesetzt werden. Das empfohlene Gewebefixiermaterial ist 10 % neutral-gepuffertes Formalin.<sup>2</sup>

Ungefähr 4 µm dicke Schnitte auf Glasobjektträger aufbringen. Bei den Trägern sollte es sich um Superfrost Plus oder um ein gleichwertiges Produkt handeln. Studien von Ventana deuten darauf hin, dass luftgetrocknete Gewebeschnitte und Zelllinienschnitte, die bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden, mindestens 6 Monate stabil sind. Jedes Labor sollte die Stabilität der Schnitte auf den Objektträgern für seine eigenen Verfahren und Aufbewahrungsbedingungen validieren.

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Für die *In-vitro*-Diagnostik (IVD) bestimmt.
2. Dieses Produkt zur Auswahl von Patienten, die für Kadcyla- oder Perjeta-Therapien infrage kommen, ist möglicherweise nicht in allen Regionen verfügbar. Bitte wenden Sie sich an Ihren Roche-Vertreter vor Ort, um die Verfügbarkeit in bestimmten Regionen zu erfahren.
3. Kontakt der Reagenzien mit Augen und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt der Reagenzien mit empfindlichen Körperteilen diese mit reichlich Wasser abspülen.

4. Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt und mit den notwendigen Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden.
5. Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden, da dies zu fehlerhaften Versuchsergebnissen führen kann.
6. Bei vorschriftsgemäßer Anwendung ist dieses Produkt nicht als Gefahrenstoff klassifiziert. Der Konservierungsstoff 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 OSHA-Kriterien für gefährliche Substanzen. Ablagerungen von NaN<sub>3</sub> können mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit großer Menge Wasser spülen, um die Ansammlung von Aziden in den Abflussrohren zu vermeiden.<sup>12</sup> Bei empfindlichen Personen sind systemische allergische Reaktionen möglich.
7. Informationen über die ordnungsgemäße Entsorgung sind bei den zuständigen Behörden erhältlich.
8. Nähere Informationen entnehmen Sie dem Sicherheitsdatenblatt des Produkts.

### FÄRBEVERFAHREN

VENTANA-Primäranantikörper wurden zur Verwendung auf VENTANA BenchMark-, BenchMark GX-, BenchMark XT- und BenchMark ULTRA-Färbearautomaten in Kombination mit VENTANA-Detektionskits und Zubehör entwickelt. Siehe Tabelle 1 und Tabelle 2 für die empfohlenen Färbeprotokolle.

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 entsprechend dem im Benutzerhandbuch des Geräts beschriebenen Verfahren angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden. Weitere Informationen zu immunhistochemischen Färbeverfahren können der Packungsbeilage des entsprechenden VENTANA-Detektionskits entnommen werden.

**Tabelle 1.** Empfohlenes Färbeprotokoll für VENTANA HER2 (4B5) mit dem VIEW DAB Detection Kit auf einem BenchMark-, BenchMark GX-, BenchMark XT- oder BenchMark ULTRA-Gerät.

Verfahrenstyp	Methode		
	BenchMark- und BenchMark GX-Gerät	BenchMark XT-Gerät	BenchMark ULTRA-Gerät
Entparaffinierung	Ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Zellaufbereitung (Antigen-Demaskierung)	Cell Conditioning 1, Standard	Cell Conditioning 1, Standard	ULTRA CC1, mild
Primäranantikörper	32 Minuten, 37 °C	32 Minuten, 37 °C	24 Minuten, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	Nicht ausgewählt	Ausgewählt	Ausgewählt
Gegenfärbung (Hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 Minuten	Hematoxylin II, 4 Minuten	Hematoxylin II, 4 Minuten
Abschließende Gegenfärbung	Bluing, 4 Minuten	Bluing, 4 Minuten	Bluing, 4 Minuten

**Tabelle 2.** Empfohlenes Färbeprotokoll für VENTANA HER2 (4B5) mit *ultraView* DAB Detection Kit auf einem BenchMark-, BenchMark GX-, BenchMark XT- oder BenchMark ULTRA -Gerät.

Verfahrenstyp	Methode	
	BenchMark-, BenchMark GX- und BenchMark XT-Gerät	BenchMark ULTRA-Gerät
Entparaffinierung	Ausgewählt	Ausgewählt
Zellaufbereitung (Antigen-Demaskierung)	Cell Conditioning 1, mild	ULTRA CC1, mild
Primärantikörper	16 Minuten, 37 °C	12 Minuten, 36 °C
ultraWash	Ausgewählt	Ausgewählt
Gegenfärbemittel	Hematoxylin II, 4 Minuten	Hematoxylin II, 4 Minuten
Abschließende Gegenfärbung	Bluing, 4 Minuten	Bluing, 4 Minuten

## VERFAHREN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

### Zelllinien-Systemkontrollen

Ventana bietet als eigenständige Produkte vier formalinfixierte, in Paraffin eingebettete, geschnittene und auf einzelne geladene Objektträger aufgebraute Zelllinienkontrollen. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (Katalog-Nr. 781-2991) können für eine Vorabvalidierung der für gefärbte Objektträger gewählten Verarbeitungsmethode mit VENTANA HER2 (4B5) nützlich sein. Diese vier Kontroll-Zelllinien zeichnen sich durch *In-situ*-Hybridisierung für die Genkopiezahl aus. Bei richtiger Aufbereitung und Färbung sollte die Anfärbung dieser Zelllinien den Angaben in Tabelle 4 entsprechen. Wenn sich die angegebene Färbung in den jeweiligen Kernen nicht zeigt, besonders im Hinblick auf die Kontrollen 1+ und 2+, sollte die Gewebefärbung wiederholt werden.

**Tabelle 3.** Eigenschaften der 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, die mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bestimmt wurden.

### Positive Gewebekontrolle

Für jede Gruppe von Prüfbedingungen und bei jedem Färbeprogang mit VENTANA HER2 (4B5) muss ein in derselben Weise wie die Patientenproben fixiertes und aufbereitetes positives Kontrollgewebe geprüft werden. In diesem Gewebe können Zell- oder Gewebestandteile enthalten sein, die sich sowohl positiv als auch negativ färben und damit als Positiv- wie auch als Negativkontrolle verwendet werden können. Als Kontrollgewebe ist frisches Sektions-/Biopsiematerial oder Material aus einem chirurgischen Eingriff geeignet. Das Gewebe muss so schnell wie möglich auf identische Weise wie das Probengewebe präpariert und fixiert werden. Mit diesem Gewebe können alle Analyseschritte von Gewebepreparation bis Färbung kontrolliert werden. Bei Verwendung eines Gewebeschnitts, der anders als die Testprobe fixiert oder präpariert worden ist, können nur Reagenzien und Verfahrensschritte kontrolliert werden, nicht aber die Fixierung und Gewebepreparation. Eine Probe mit schwach positiver Färbung ist zur optimalen Qualitätskontrolle und zum Aufspüren geringgradiger Reagenzabschwächung besser geeignet. Idealerweise sollte ein Gewebe gewählt werden, von dem eine schwache, aber positive Färbung bekannt ist, um sicherzustellen, dass das System auf geringgradigen Reagenzabbau oder Probleme mit der IHC-

Methodik reagiert. Im Allgemeinen ist aber ein neoplastisches Gewebe, das für HER2 positiv ist, aufgrund der Natur seiner Pathologie (Überexprimierung) stark positiv. Ein Beispiel für eine positive Kontrolle für HER2 (4B5) ist eine bekanntermaßen schwach HER2-positive Probe eines invasiven Mammakarzinoms oder eine schwach positive Magenkarzinomprobe. Die positiv gefärbten Gewebekomponenten (Membranfärbung von neoplastischen Zellen) dienen zur Bestätigung, dass der Antikörper aufgebracht wurde und das Gerät ordnungsgemäß funktioniert.

Nachweislich positive Gewebekontrollen dürfen nur zur Kontrolle der korrekten Leistung von verarbeitetem Gewebe und Testreagenzien verwendet werden und nicht als Hilfe bei der Erstellung einer spezifischen Diagnose von Patientenproben.

### Negative Gewebekontrolle

Der gleiche Objektträger, der für die positive Gewebekontrolle (duktaler oder lobulärer Brustkrebs oder Magenkrebs) verwendet wurde, kann auch als negative Gewebekontrolle verwendet werden. Die nichtfärbenden Komponenten (umgebendes Stroma, lymphatische Zellen und Blutgefäße) müssen das Fehlen einer spezifischen Färbung zeigen und einen Hinweis auf die spezifische Hintergrundfärbung (falsch-positiv) mit dem primären Antikörper zeigen. Ein bekanntes negatives Gewebe verwenden, das auf die gleiche Weise fixiert, verarbeitet und eingebettet wurde wie die Patientenproben.

### Negative Reagenzkontrolle

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

### Unerklärliche Abweichungen

Abweichungen bei Kontrollergebnissen, für die es keine stichhaltige Erklärung gibt, bitte umgehend der zuständigen Kundendienstvertretung melden. Wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle die Spezifikationen nicht erfüllen, sind die Patientenergebnisse ungültig. Siehe Abschnitt „Fehlerbehebung“ in dieser Packungsbeilage. Nach Auffinden des Fehlers und Beheben der Fehlerursache den Test mit Patientenproben wiederholen.

### Assay-Verifizierung

Vor der ersten Verwendung eines Primärantikörper- oder Färbesystems in einem Diagnoseverfahren muss die spezifische Wirksamkeit des Antikörpers überprüft werden. Zu diesem Zweck wird der Primärantikörper auf einer Reihe von Gewebeproben mit bekannten IHC-Merkmalen getestet, die bekannte positive und negative Gewebe enthalten müssen (siehe dazu den Abschnitt „Positive Gewebekontrolle“ in der Packungsbeilage des Primärantikörpers und die Empfehlungen zur Qualitätskontrolle des College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, der Anatomic Pathology Checklist<sup>13</sup> oder der CLSI Approved Guideline<sup>14</sup> oder beide Dokumente). Diese Verfahren zur Qualitätskontrolle müssen für jede neue Antikörpercharge und bei jeder Änderung der Assayparameter wiederholt werden. Brust- und Magenkrebsgewebe mit bekanntem HER2-Status sind für die Assay-Verifizierung geeignet.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Der automatisierte VENTANA-Immunfärbeprogang führt dazu, dass sich an den von VENTANA HER2 (4B5) lokalisierten Antigenregionen ein braun gefärbtes Reaktionsprodukt (DAB) ablagert. Ein qualifizierter, mit immunhistochemischen Verfahren vertrauter Pathologe muss erst die Kontrollen auswerten und das gefärbte Produkt qualifizieren, bevor die Ergebnisse interpretiert werden können.

### Positive Kontrollen

Die gefärbte positive Gewebekontrolle muss zuerst untersucht werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Ein ordnungsgemäß gefärbtes Reaktionsprodukt in der Membran der Zielzellen ist Anzeichen für eine positive Reaktionsfähigkeit. Abhängig von der Inkubationszeit und der Wirkungsstärke des verwendeten Hämatoxylins führt die Gegenfärbung zu einer hell- bis dunkelblauen Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

Wenn mit der positiven Gewebekontrolle keine entsprechende positive Färbung nachgewiesen werden kann, müssen alle Ergebnisse mit den Testpräparaten als ungültig bewertet werden.

### Negative Gewebekontrollen

Die negative Gewebekontrolle wird nach der positiven Gewebekontrolle untersucht, um zu überprüfen, ob die spezifische Anfärbung des Zielantigens mit dem Primärantikörper korrekt erfolgt ist. Nicht vorhandene spezifische Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt die fehlende unspezifische Kreuzreaktivität mit Zellen oder

Zellkomponenten. Bei spezifischer Färbung der negativen Gewebekontrolle müssen die mit den Patientenproben erzielten Ergebnisse als ungültig bewertet werden.

#### Negative Reagenzkontrollen

Bei Auftreten von unspezifischer Färbung ist das Erscheinungsbild diffus. In Gewebeschnitten mit exzessiver Formalinfixierung kann es zum sporadischen Auftreten von leichter Färbung von Bindegewebe kommen. Für die Interpretation der Färbegergebnisse sollten intakte Zellen verwendet werden, da nekrotische oder degenerierte Zellen häufig eine unspezifische Färbung annehmen.

#### Patientengewebe

Die Untersuchung der Patientenproben erfolgt zum Schluss. Die Intensität der positiven Färbung muss unter Berücksichtigung jeglicher Hintergrundfärbungen der negativen Reagenzkontrolle bewertet 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 der Interpretation aller immunhistochemischen Ergebnisse sollte die Morphologie aller Gewebeprobe zusätzlich auch mit Hilfe eines mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittes untersucht werden.

Die morphologischen Resultate und die entsprechenden klinischen Daten des Patienten müssen von einem qualifizierten Pathologen interpretiert werden.

### AUSWERTUNG DER FÄRBUNG

#### Bewertungskonventionen für die Interpretation von VENTANA HER2 (4B5) bei Mammakarzinom

Brustkarzinome, die bei einer HER2-Protein-Überexpression positiv beurteilt werden, müssen folgende Schwellenwertkriterien bezüglich der Intensität der Färbung (2+ oder größer auf einer Skala von 0 bis 3+) und dem prozentualen Anteil an positiven Tumorzellen (größer 10 %) erfüllen. Die Färbung muss auch im Bereich der Zellmembran zu finden sein. Es kann noch eine Färbung des Zytoplasmas vorliegen, diese jedoch spielt bei der Entscheidung, ob das Ergebnis positiv ist, keine Rolle. Den gesamten Gewebeschnitt untersuchen, um sicherzustellen, dass die Bewertung nur in gut konservierten und gut gefärbten Bereichen vorgenommen wird. Eine Färbung, die die Zytoplasmamembran komplett umgibt, sollte mit einer Intensität von „2+“ oder „3+“ bewertet werden. Eine teilweise Färbung der Membran sollte die Bewertung „1+“ erhalten. Es kann erforderlich sein, dass Grenzfälle mit einer 40fachen oder höheren Vergrößerung untersucht werden müssen, um zwischen den Intensitäten von „1+“ und „2+“ unterscheiden zu können. Im Gegensatz zu mit „3+“ bewerteten Fällen weist eine mit „2+“ bewertete Färbung einen frischeren und klarer abgegrenzten Ring auf, wohingegen mit „3+“ bewertete Fälle eine sehr dicke Außenlinie zeigen. Weiter unten finden Sie eine Kurzübersicht der Färbekriterien. Siehe hierzu die *Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma*, die eine detailliertere Beschreibung mit Abbildungen von Färbungen mit VENTANA HER2 (4B5) enthält.

**Tabelle 4.** Kriterien für die Intensität und die Muster der Zellmembranfärbung mit VENTANA HER2 (4B5) bei Brustkrebs.

Färbemuster	Score (zur Weiterleitung an den behandelnden Arzt)	Beurteilung der HER2-Färbung
Keine Membranfärbung beobachtet	0	Negativ
Blasse, teilweise Färbung der Membran in jedem Bereich der Krebszellen	1+	Negativ
Schwache, vollständige Färbung der Membran, mehr als 10 % der Krebszellen	2+	Nicht eindeutig*
Intensive, vollständige Färbung der Membran, mehr als 10 % der Krebszellen	3+	Positiv

\* Rückgriff auf ISH empfohlen

#### Bewertungskonventionen für die Interpretation von VENTANA HER2 (4B5) bei Magenkarzinom

Magenkarzinome, die bei einer HER2-Protein-Überexpression positiv beurteilt werden, müssen folgende Schwellenwertkriterien bezüglich der Intensität der Färbung (2+ oder größer auf einer Skala von 0 bis 3+) und des prozentualen Anteils an positiven Tumorzellen erfüllen. Die Färbung muss sich in der Zellmembran befinden, aber braucht nicht den gesamten Umfang zu belegen, da die basolaterale Färbung regelmäßig beobachtet wird und für die Wertung berücksichtigt werden sollte. Die Färbung des Zytoplasmas bzw. des Zellkerns kann vorliegen, aber diese Färbung wird für eine positive Bestimmung nicht herangezogen. Bei Magenkrebs hängt der Prozentsatz der positiven Tumorzellen davon ab, ob die Probe einer Biopsie (≥ 5 kohäsive Zellen) oder Resektion (≥ 10 %) entstammt.

Beim Aufstellen der Wertungsrichtlinien für die HER2-Immunhistochemie bei Magenkrebs<sup>15</sup> sollte beachtet werden, dass trotz einer starken Membranfärbung als Nachweis einer HER2-Überexpression in neoplastischen Zellen diese nicht vollständig umlaufend sein muss.

Rüschhoff et al. berichteten über diffuse Zytoplasma-Färbungen mit oder ohne Zellkernfärbung bei Magenkrebs.<sup>16</sup> Nur die Membranfärbung darf für die Bestimmung der HER2-Protein-Expression von Magenkrebs herangezogen werden.

Die immunhistochemische Färbung mit dem Klon 4B5 kann Zytoplasma- und Zellkernfärbungen der gesunden Magenschleimhaut und seltener der neoplastischen Zellen bei Magenkrebs und Magen-/Speiseröhrenkrebs erzeugen. Die Natur dieser Zytoplasma- und Zellkernfärbung ist gegenwärtig unbekannt. Dieses Färbungsmuster sollte nicht mit der diskreten Membranfärbung verwechselt werden, da es für einen positiven Nachweis für HER2 in neoplastischen Zellen indikativ ist.

Siehe hierzu die *Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma*, die eine detailliertere Beschreibung mit Fotomikrografien von Färbungen mit VENTANA HER2 (4B5) enthält.

**Tabelle 5.** Kriterien für die Intensität und die Muster der Zellmembranfärbung mit VENTANA HER2 (4B5) bei Magenkrebs.

Färbungsmuster – Resektionsproben	Färbungsmuster – Biopsieproben	Score (Bericht an den anfordernden Arzt)	Beurteilung der HER2-Färbung
Keine Reaktivität <u>oder</u> Membranreaktivität bei < 10 % der Tumorzellen	Keine Reaktivität oder Membranreaktivität in den Tumorzellen	0	Negativ
Schwache/kaum wahrnehmbare Membranreaktivität bei ≥ 10 % der Tumorzellen; Zellen sind nur bei einem Teil ihrer Membran reaktiv	Tumorzell-Cluster* mit schwacher/kaum wahrnehmbarer Membranreaktivität, ungeachtet des prozentualen Anteils an gefärbten Tumorzellen	1+	Negativ
Schwach bis mäßig vollständige, basolaterale oder laterale Membranreaktivität bei ≥ 10 % der Tumorzellen	Tumorzell-Cluster mit einer schwach bis mäßig vollständigen, basolateralen oder lateralen Membranreaktivität, ungeachtet des Anteils an gefärbten Tumorzellen	2+	Nicht eindeutig**
Starke und vollständige, basolaterale oder laterale Membranreaktivität bei ≥ 10 % der Tumorzellen	Tumorzell-Cluster mit einer starken und vollständigen, basolateralen oder lateralen Membranreaktivität, ungeachtet des Anteils an gefärbten Tumorzellen	3+	Positiv

\* ≥ 5 kohäsive Zellen

\*\* Rückgriff auf ISH empfohlen

## EINSCHRÄNKUNGEN

### Allgemeine Einschränkungen

- Die Immunhistochemie ist ein aus mehreren Schritten bestehendes Diagnoseverfahren, das hinsichtlich der Wahl der geeigneten Reagenzien und Gewebeproben sowie bezüglich Fixierung, Aufbereitung und Präparation der immunhistochemischen Objektträger und der Interpretation der Färbeargebnisse eine besondere Schulung erfordert.
- 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 Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können die Folge von Abweichungen bei Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes sein.
- Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiver Gewebefärbung oder deren Fehlen muss anhand der Krankengeschichte, der Morphologie und sonstiger histopathologischer Kriterien erfolgen. Die klinische Interpretation der Gewebefärbung oder deren Fehlen muss durch morphologische Untersuchungen und korrekte Kontrollen sowie andere diagnostische Tests vervollständigt werden. Es liegt in der Verantwortung des qualifizierten Pathologen, zur Auswertung der eingefärbten Präparate mit den zur Färbung verwendeten Antikörpern, Reagenzien und Methoden vertraut zu 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.
- 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. Anwender, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation der Patientenergebnisse.
- Dieses Produkt ist nicht für die Anwendung in der Durchflusszytometrie ausgelegt, und es liegen keine Leistungsmerkmale vor.
- Bei Gewebe, das im Vorfeld nicht getestet wurde, können unerwartete Reaktionen mit den verwendeten Reagenzien auftreten. Aufgrund der biologischen Schwankungen bei Antigenexpression in Neoplasmen oder anderem pathologischen Gewebe können unerwartete Reaktionen auch bei getesteten Gewebegruppen nicht vollkommen ausgeschlossen werden.<sup>17</sup> Bei dokumentierten unerwarteten Reaktionen den zuständigen Kundendienstmitarbeiter verständigen.
- Gewebeproben von Personen mit Hepatitis-B-Infektion und mit dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettichperoxidase zu unspezifischer Färbung führen.<sup>18</sup>
- Falsch positive Ergebnisse können durch nicht immunologische Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten entstehen. Je nach Art der verwendeten Immunfärbung können sie ebenfalls durch Pseudoperoxidase-Aktivität (Erythrozyten), endogene Peroxidase-Aktivität (Cytochrom C) oder endogenes Biotin (z. B. Leber, Hirn, Brust, Niere) verursacht werden.<sup>19</sup>
- 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

- Der Antikörper wurde wie in den Tabellen 1 und 2 angegeben für VENTANA-Plattformen und -Nachweismittel optimiert. Durch unterschiedliche Gewebefixierung und -aufbereitung kann es erforderlich sein, die Inkubationszeit der Primäntikörper je nach Probe nach oben oder unten zu variieren. Weiterführende Informationen über Fixierungsvariablen siehe „Immunohistochemistry Principles and Advances“.<sup>20</sup>
- In Kombination mit VENTANA-Detektionskits und -zubehör weist der Antikörper Antigen nach, die eine übliche Formalinfixierung, Gewebepreparation und -sektionierung überleben. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, tragen die Verantwortung für die Interpretation und Validierung der Patientenergebnisse.
- Knochenmark wurde nicht auf Spezifität getestet. Der Benutzer muss sich vor der Interpretation der Färbereultate von der ordnungsgemäßen Färbung der oben genannten Gewebe überzeugen.

- Die immunhistochemische Färbung mit dem Klon 4B5 kann Zytoplasma- und Zellkernfärbungen der gesunden Magenschleimhaut und seltener der neoplastischen Zellen bei Magenkrebs und Magen-/Speiseröhrenkrebs erzeugen. Die Natur dieser Zytoplasma- und Zellkernfärbung ist gegenwärtig unbekannt. Dieses Färbemuster sollte nicht mit der diskreten Membranfärbung verwechselt werden, die ein Hinweis auf HER2-Positivität von neoplastischen Zellen ist.

### LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit des VENTANA HER2 (4B5)-Antikörpers wurde in Vergleichsstudien zu Spezifität, Wiederholbarkeit und Methode überprüft. Die gesamte Färbung erfolgte unter Einhaltung des oben aufgeführten MIEW DAB Detection Kit-Protokolls auf einem Benchmark XT-Färbautomaten, sofern nicht anderweitig angegeben. Die Daten wurden zuerst für Brustkrebs, anschließend für Magenkrebs vorgestellt.

- Spezifität:** Die Spezifität von Klon 4B5 wurde durch eine Studie bestimmt, die keine spezifische Membranfärbung für die meisten gesunden Gewebe zeigte. Es wurden die folgenden Färbereultate erzielt: Nebenniere (0/3), Brust (0/3), Kleinhirn (0/3), Gehirn (0/3), Zervix (0/3), Kolon (0/3), Ösophagus (1/3), Herz (0/2), Niere (0/3), Leber (0/3), Lunge (0/3), Mesothelzellen (0/3), Eierstöcke (0/3), Pankreas (0/3), Nebenschilddrüse (1/3, fokale Membranfärbung), peripherer Nerv (1/3), Hypophyse (0/2), Prostata (1/3), Speicheldrüse (0/3), Skelettmuskel (0/3), Haut (0/3), Dünndarm (0/3), Milz (0/3), Hoden (0/3), Thymus (0/2), Schilddrüse (0/3), Tonsille (2/3 fokale Färbung der Oberflächenepithelzellen) und Uterus (0/3). Die Spezifität von Klon 4B5 wurde auch durch eine Studie bestimmt, die keine spezifische Membranfärbung bei den meisten neoplastischen Geweben zeigte. Es wurden die folgenden Färbereultate erzielt: Brustkrebs (1/4), Karzinoid (0/2), Kolonkrebs (1/3), hepatozellulärer Krebs (0/5), Leiomyom (0/2), Lungenkrebs (0/2), Lymphom (0/3), Melanom (0/2), Eierstockkrebs (1/2), Pankreaskrebs (0/3), Prostatakrebs (0/3), Nierenzellkrebs (0/5), Sarkom (0/2), Magenkrebs (0/3), Schilddrüsenkrebs (0/3) und undifferenzierter Krebs (0/1). Positive Färbungen bei Mandelepithel, Speiseröhrenepithel, Prostata, Nerven, Nebenschilddrüse, Brustkrebs, Dickdarm und Eierstockkrebs sind konsistent mit der veröffentlichten Literatur zur Expressierung von HER2.
- Empfindlichkeit:** Die Empfindlichkeit wird in den Tabellen 9 und 11 aufgezeigt: Klon-4B5-IHC-Konsenswerte von drei Pathologen im Vergleich zu FISH.
- Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Färbedurchlaufs auf den Farbeinstruments-Plattformen BenchMark und BenchMark XT wurde durch die Färbung von jeweils drei Objektträgern von fünf Brustkrebsgeweben mit einer Bewertung von 0, 1+, 2+ und 3+ der HER2-Expression ermittelt. In jedem der Fälle färbten sich drei von drei Objektträgern in angemessener Weise innerhalb eines Laufs und bei allen getesteten Instrumentenplattformen. Benutzern wird empfohlen, die Wiederholpräzision der Ergebnisse innerhalb von Läufen zu überprüfen, indem sie verschiedene Sätze serieller Schnitte mit niedrigen, mittleren und hohen Antigenkonzentrationen in einem Lauf färben.
- Die Reproduzierbarkeit der Färbung zwischen Färbeläufen und Plattformen wurde durch Färbung von jeweils drei Objektträgern von fünf Brustkrebsgeweben mit einer Bewertung von 0, 1+, 2+ und 3+ der HER2-Expression in drei verschiedenen Läufen auf den Geräteplattformen BenchMark und BenchMark XT ermittelt. In jedem der Fälle färbten sich neun von neun Objektträgern in angemessener Weise innerhalb von drei Geräteläufen und bei allen getesteten Geräteplattformen.
- Inter-Labor- und Inter-Ausleser-Bewertungsreproduzierbarkeit des BenchMark XT-Geräts:** Drei Labors nahmen an der Inter-Labor-Reproduzierbarkeitsstudie teil. Objektträger mit neutral gepufferten, formalinfixierten Gewebeschnitten von 40 Fällen invasiver Mammakarzinome (jeweils 10 aus jeder HER2-Kategorieklasse (0-1+, 2+, 3+)) und sechs (6) PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides wurden an jedes der Labors zum Färben auf einem VENTANA BenchMark XT-Färbautomaten mit Hilfe des empfohlenen Färbeprotokolls gesandt. Die Kontrollen umfassten PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und einen zweiten Objektträger für jeden Fall, der mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt war. In keiner der Einrichtungen gab es im Rahmen der durchgeführten Kontrollen ungültige Läufe. Die Ergebnisse wurden von Ventana analysiert. Vierunddreißig von vierzig (34/40) Objektträgern zeigten über die Einrichtungen hinweg eine ähnlich starke Färbintensität. Sechs Proben (6/40 oder 15 %) wichen um nicht mehr als einen Intensitätsschritt ab. Drei (3/6) Proben wichen um einen Wert zwischen 0 und 1+ ab, beide Werte werden als negativ angesehen. Zwei Proben (2/40 oder 5 %) wichen um einen Wert zwischen 2+ und 3+ ab, und ein Probe (1/40) um einen Wert zwischen 1+ und 2+.
- Inter-Ausleser-Bewertungsreproduzierbarkeit des BenchMark XT-Geräts:** In allen 40 Fällen (100 %) stimmten mindestens zwei von drei Pathologen überein.

7. Die Charge-zu-Charge-Reproduzierbarkeit wurde durch automatische Färbung von fünf Brustkrebsgeweben mit HER2-Exprimierungs-Scores von 0, 1+, 2+, and 3+ anhand von drei Chargen HER2 (4B5) bestimmt. Die gefärbten Gewebeprobe wurden von drei qualifizierten Pathologen auf einer Skala von 0 bis 3+ bewertet. Es gab eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen den Chargen und den Auslesern bezüglich der drei Objektträger und der fünf gefärbten Gewebe.
8. Vergleichsstudien von Klon 4B5 eines monoklonalen Kaninchen-Antikörpers mit dem Klon des monoklonalen Maus-Antikörpers PATHWAY HER-2/neu (CB11): Zusammenfassung der durchgeführten Studien. Es wurde eine Methodenvergleichsstudie durchgeführt, um die Korrelation von Klon 4B5 mit PATHWAY HER-2/neu (CB11) und PathVysion Her-2 FISH zu prüfen, beides früher bereits von der FDA zugelassene Diagnostik-Tests. Sechs Prüfer nahmen an der Studie teil. Zwei Gruppen bestehend aus drei verschiedenen Prüfern bewerteten zwei unabhängige Kohorten (Kohorte 1: n=178, Kohorte 2: n=144) unter Verwendung von bekannten Brustkrebsfällen, die mit PATHWAY HER-2/neu (CB11) und dem Klon 4B5 gefärbt wurden. Die FISH-Daten wurden der Patientengeschichte entnommen. Ein Konsenswert der drei Ausleser wurde für jeden Antikörper und jeden Fall erzeugt, um die Variabilität innerhalb der Ausleser, die bei der Bewertung von HER2 bekannt war, zu reduzieren.<sup>21,22,23</sup> Es wurden insgesamt 322 Fälle bewertet. Die mit PATHWAY HER-2/neu (CB11) gefärbten Objektträger wurden gemäß den in der Packungsbeilage von PATHWAY HER-2/neu (CB11) angegebenen Herstelleranweisungen verarbeitet und gefärbt. Es lag im Durchschnitt ein Jahr zwischen der Färbung und der Prüfung der mit PATHWAY HER-2/neu (CB11) gefärbten Objektträger. Da die Bewertungen eines der sechs Ausleser außerhalb des Konfidenzintervalls (KI) lagen, wurden die Daten der beiden Kohorten wie folgt vorgestellt:

- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $72+12+1+1/73+20 = 92,5\%$  (95 % KI = 85,2 % – 96,9 %).
  - Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $80/85 = 94,1\%$  (95 % KI = 86,8 % – 98,1 %).
- Gesamtübereinstimmung ist  $72+12+1+1+80/178 = 93,3\%$  (95 % KI = 88,5 % – 96,4 %).

**Tabelle 8.** Kohorte 1: Konsens für PATHWAY HER-2/neu (CB11)-IHC-Scores der drei Pathologen im Vergleich zu FISH.

PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Gesamt	86	58	144

Kohorte 1: Eigenschaften der Ergebnisse für PATHWAY HER-2/neu (CB11) und FISH, 2x2-Darstellung (in der die Werte 2 und 3 als positiv erachtet wurden).

- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $32+32/86 = 74,4\%$  (95 % KI = 63,8 % – 83,2 %).
  - Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $53/58 = 91,4\%$  (95 % KI = 80,9 % – 97,1 %).
- Gesamtübereinstimmung ist  $32+32+53/144 = 81,2\%$  (95 % KI = 73,9 % – 87,2 %).

#### Reproduzierbarkeit der Proben der Vergleichsstudie zwischen den Pathologen

**Tabelle 6.** Kohorte 1: Konsens-IHC-Scores der drei Pathologen.

Klon 4B5-Score	PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score			
	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: Eigenschaften der Ergebnisse für die 3x3-Darstellung.  
Gesamtübereinstimmung ist  $29+13+53/143 = 66,4\%$  (95 % KI = 38,6 % – 59,7 %).
- Kohorte 1: Leistungsmerkmale für die 2x2-Präsentation (die Bewertungen HER-2-Antikörper-positiv (2+ und 3+) und -negativ (0+ und 1+) sind zusammengefasst).
- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $29+2+24+13/31+37 = 100\%$  (95 % KI = 97,5 % – 100 %).
  - Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $53/75 = 70,7\%$  (95 % KI = 58,5 % – 80,1 %).
- Gesamtübereinstimmung ist  $29+2+2+13+53/143 = 84,7\%$  (95 % KI = 78,2 % – 90,0 %).

**Tabelle 7.** Kohorte 2: Konsens-IHC-Scores der drei Pathologen.

Klon 4B5-Score	PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score			
	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: Eigenschaften der Ergebnisse für die 3x3-Darstellung.  
Gesamtübereinstimmung ist  $72+12+80/178 = 92,1\%$  (95 % KI = 80,1 % – 93,1 %).
- Kohorte 2: Eigenschaften der Ergebnisse für die 2x2-Darstellung (Werte für HER2-Antikörper positiv (2+ und 3+) und negativ (0+ und 1+) sind kombiniert).

**Tabelle 9.** Kohorte 1: Klon-4B5-IHC-Konsenswerte von drei Pathologen im Vergleich zu FISH.

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

Kohorte 1: Eigenschaften der Ergebnisse für Klon 4B5 und FISH, 2x2-Darstellung (in der die Werte 2 und 3 als positiv erachtet wurden).

- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $55+25/86 = 93,0\%$  (95 % KI = 87,9 % – 96,3 %).
  - Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $47/58 = 81,0\%$  (95 % KI = 73,4 % – 86,0 %).
- Gesamtübereinstimmung ist  $55+25+47/144 = 88,2\%$  (95 % KI = 82,1 % – 92,2 %).

**Tabelle 10.** Kohorte 2: Konsens für PATHWAY HER-2/neu (CB11)-IHC-Scores der drei Pathologen im Vergleich zu FISH.

PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score	FISH-Ergebnis		
	Positiv	Negativ	Gesamt
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Gesamt	93	85	178

Kohorte 2: Eigenschaften der Ergebnisse für PATHWAY HER-2/neu (CB11) und FISH, 2x2-Darstellung (in der die Werte 2 und 3 als positiv erachtet wurden).

- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $72+13/93 = 91,3\%$  (95 % KI = 85,0 % – 96,7 %).
  - Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $77/85 = 90,6\%$  (95 % KI = 83,9 % – 96,3 %).
- Gesamtübereinstimmung ist  $72+13+77/178 = 91,0\%$  (95 % KI = 86,5 % – 94,9 %).

**Tabelle 11.** Kohorte 2: Klon-4B5-IHC-Konsenswerte von drei Pathologen im Vergleich zu FISH.

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

Kohorte 2: Eigenschaften der Ergebnisse für Klon 4B5 und FISH, 2x2-Darstellung (in der die Werte 2 und 3 als positiv erachtet wurden).

- Positive prozentuale Übereinstimmung ist  $72+11/93 = 89,2\%$  (95 % KI = 82,5 % – 95,1 %).
- Negative prozentuale Übereinstimmung ist  $77/85 = 90,6\%$  (95 % KI = 84,0 % – 96,4 %).

Gesamtübereinstimmung ist  $72+11+77/178 = 90,0\%$  (95 % KI = 85,4 % – 93,6 %).

#### Reproduzierbarkeit der Proben der Vergleichsstudie zwischen den Pathologen

Da bekannt ist, dass verschiedene Pathologen bezüglich der immunhistologischen Präparate zu unterschiedlichen Interpretationen gelangen können, arbeiteten in jeder der beiden Kohorten jeweils drei Pathologen (insgesamt also 6 Pathologen), um alle Proben auszulesen. Es wurde eine Zwei-von-Drei-Regel angewandt, um über die Endergebnisse zu entscheiden. Unten finden Sie eine Zusammenfassung der von den drei Pathologen erarbeiteten variablen Ergebnisse der Vergleichsstudienproben nach Kohorte.

**Tabelle 12.** Kohorte 1: Klon 4B5-Score für die drei Pathologen.

HER2-Score	Klon 4B5-Score		
	Prüfer 1	Prüfer 2	Prüfer 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Gesamt	174	178	178

Hinweis: Insgesamt drei Proben variierten um mehr als eine Stufe (d. h. 0, 2+), als sie von den drei Pathologen bewertet wurden.

- Probe 1: Ein Pathologe vergab 2+, zwei Pathologen vergaben 0+.
- Probe 2: Ein Pathologe vergab 0+, zwei Pathologen vergaben 2+.
- Probe 3: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 1+ und der dritte 2+.

**Tabelle 13.** Kohorte 1: PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Bewertung der drei Pathologen.

HER2-Score	PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score		
	Prüfer 1	Prüfer 2	Prüfer 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Gesamt	174	178	178

Hinweis: Insgesamt eine Probe variierte um mehr als eine Stufe (d. h. 1 – 3+), als sie von den drei Pathologen bewertet wurde.

- Probe 1: Ein Pathologe vergab 1+, der zweite 2+ und der dritte 3+.

**Tabelle 14.** Kohorte 2: Klon 4B5-Score für die drei Pathologen.

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

Hinweis: Insgesamt sechs Proben wichen bei der Bewertung durch die drei Pathologen um mehr als einen Einheitschritt (z. B. 0, 3+) ab.

- Probe 1: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 0+ und der dritte 2+.
- Probe 2: Ein Pathologe vergab 1+, der zweite 1+ und der dritte 3+.
- Probe 3: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 2+ und der dritte 2+.
- Proben 4 und 5: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 2+ und der dritte 2+.
- Probe 6: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 3+ und der dritte 3+.

**Tabelle 15.** Kohorte 2: PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score für die drei Pathologen.

HER2-Score	PATHWAY HER-2/neu (CB11)-Score		
	Prüfer 4	Prüfer 5	Prüfer 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Gesamt	144	144	144

Hinweis: Insgesamt acht Proben variierten um mehr als eine Stufe (d. h. 0, 2+), als sie von den drei Pathologen bewertet wurden.

- Proben 1 – 6: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 1+ und der dritte 2+.
- Proben 7 und 8: Ein Pathologe vergab 0+, der zweite 2+ und der dritte 2+.

Im Folgenden finden Sie eine Aufstellung der Bereiche der Prozentübereinstimmungen über die Paare der Pathologen hinweg (drei Paare pro Kohorte).

**Tabelle 16.** Bereiche der 2x2\*-Übereinstimmungen für die drei Pathologen.

	Gesamtübereinstimmung in Prozent	Positive Übereinstimmung in Prozent	Negative Übereinstimmung in Prozent
<b>Klon 4B5 im Vergleich zu PATHWAY HER-2/neu (CB11)</b>			
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%
<b>Klon 4B5 im Vergleich zu FISH</b>			
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%
<b>Vergleich zwischen PATHWAY HER-2/neu (CB11) und FISH</b>			
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.

**Schlussfolgerung:** Die Daten aus diesen Studien weisen darauf hin, dass der Primärantikörper von Klon 4B5 bei der Auffindung der richtigen Membranfärbung für gesunde und neoplastische Gewebe spezifisch und reproduzierbar war. Die Daten des Methodenvergleichs zeigten, dass der Antikörper von Klon 4B5 als Hilfe bei der Beurteilung von Brustkrebspatienten indiziert ist, für die eine Behandlung mit Herceptin in Betracht gezogen wird.

9. **Leistungsmerkmale des BenchMark ULTRA-Geräts unter Verwendung des MIEW DAB Detection Kit oder *ultraView* Universal DAB Detection Kit:**

Inter-Labor- und Inter-Tag-Reproduzierbarkeit der Färbung des BenchMark ULTRA-Geräts: Drei Laboratorien in verschiedenen Einrichtungen in den Vereinigten Staaten haben an der Studie zur Inter-Labor-Wiederholpräzision teilgenommen. Objektträger mit formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 48 Fällen invasiver Mammakarzinome (12 aus jeder HER2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)) und 1 Paar PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides für jeden der 12 Färbeläufe wurden an die Studieneinrichtungen zum Färben in einem VENTANA BenchMark ULTRA-Färbautomaten unter Verwendung des empfohlenen Färbeprotokolls und des *ultraView* Universal DAB Detection Kit verteilt. Die Kontrollen umfassten PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und einen zweiten Objektträger für jeden Fall, der mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt war. Pathologen, die gegenüber dem Fallstatus verblindet waren, bewerteten die Objektträger und gaben einen klinischen Score ab (d. h. 0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse wurden von Ventana analysiert. Mit Hilfe einer Standardnomenklatur für 2x2-Tabellen wurde die durchschnittliche positive Übereinstimmung (APA) über die Einrichtungen als  $[2a/(2a+b+c)]$  und die durchschnittliche negative Übereinstimmung (ANA) als  $[2d/(2d+b+c)]$  berechnet. Über alle Einrichtungen hinweg betrug die APA zwischen den Einrichtungen auf der Basis der klinischen Bewertungen (positiv, negativ) 90,0 % (108/120), und die ANA betrug 92,9 % (156/168). Für einen paarweisen Vergleich der Einrichtungen wurde die APA als  $a/(a+c)$  und die ANA als  $d/(b+d)$  berechnet. Die APA-Raten zwischen den Einrichtungen betragen 93,0 % (40/43), 87,2 % (34/39) und 89,5 % (34/38) für Einrichtung A vs. Einrichtung B, Einrichtung A vs. Einrichtung C beziehungsweise Einrichtung B vs. Einrichtung C. Die ANA-Raten zwischen den Einrichtungen betragen 94,3 % (50/53), 91,2 % (52/57) und 93,1 % (54/58) für Einrichtung A vs. Einrichtung B, Einrichtung A vs. Einrichtung C beziehungsweise Einrichtung B vs. Einrichtung C.

Die folgenden Tabellen sind 3x3-Darstellungen der Ergebnisse für jeden Ausleser, basierend auf den klinischen Scores, in denen 2+ und 3+ getrennt waren.

**Tabelle 17.** 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate von Einrichtung A und Einrichtung B für Klon 4B5 im BenchMark ULTRA mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Einrichtung A	Einrichtung B			Gesamt
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
<b>Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>27</b>	<b>48</b>
<b>Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)</b>				<b>43/48 (89,6)</b>

**Tabelle 18.** 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate von Einrichtung A und Einrichtung C für Klon 4B5 im BenchMark ULTRA mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Einrichtung A	Einrichtung C			Gesamt
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
<b>Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>48</b>
<b>Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)</b>				<b>42/48 (87,5)</b>

**Tabelle 19.** 3x3-Analyse der Inter-Labor-Übereinstimmungsrate von Einrichtung B und Einrichtung C für Klon 4B5 im BenchMark ULTRA mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Einrichtung B	Einrichtung C			Gesamt
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
<b>Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>48</b>
<b>Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA): n/N (%)</b>				<b>44/48 (91,7)</b>

10. **BenchMark ULTRA Inter-Tag-Reproduzierbarkeit der Färbung des Geräts:**

Der Anteil der Inter-Tag-Reproduzierbarkeit (IDR) der Studie umfasste 12 Fälle mit einer gewollten Streuung von ungefähr drei (3) Fällen für jeden klinischen Wert (0, 1+, 2+, 3+). Die insgesamt fünf Durchläufe auf dem BenchMark ULTRA-Gerät dauerten in der einzelnen Einrichtung (Standort C), die den IDR-Anteil der Studie durchführte, etwas über 20 Tage, so dass keine zwei Färbetage aufeinander folgten. Die IDR-APA und -ANA-Raten waren, basierend auf dem klinischen Score der Färbung von Klon 4B5 am Standort C, beide über alle Tage 100 %. Die prozentualen Gesamtübereinstimmungsrate (OPA) für die Inter-Tag-Vergleiche, basierend auf den klinischen Scores, betragen für jeden der Tag-zu-Tag-Vergleiche und für alle Tage zusammengenommen 100 %.

11. **Vergleichsstudie der BenchMark ULTRA-Färbepattform mit den BenchMark XT-Färbepattformen:**

Zwei färbende Laboratorien und drei ablesende Einrichtungen in den Vereinigten Staaten nahmen an der Plattform-Vergleichsstudie teil. Objektträger mit formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 280 Fällen invasiver Mammakarzinome (ungefähr 70 Fälle aus jeder HER2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)) wurden nach dem Zufallsprinzip an die beiden färbenden Einrichtungen (140 Fälle für jede Einrichtung) zum Färben auf einem BenchMark XT-Gerät und einem BenchMark ULTRA-Gerät mit den jeweils empfohlenen Färbeprotokollen und dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit verteilt. Die Kontrollen umfassten PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und einen zweiten Objektträger für jeden Fall, der mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt war. Die gefärbten Fallproben aus Einrichtung 1 und Einrichtung 2 wurden in vier Objektträgersets unterteilt und drei verschiedenen qualifizierten Auslesern (Pathologen) vorgelegt (jeweils nur ein Set): einem Ausleser in Einrichtung 1, einem in Einrichtung 2 und einem in Einrichtung 3. Die Pathologen, die gegenüber dem Fallstatus und der Färbepattform verblindet waren, bewerteten alle vier Objektträgersets und gaben einen klinischen Score für jeden Fall ab (d. h. 0, 1+, 2+, 3+). Die Ergebnisse wurden von Ventana analysiert. Die PPA-Raten (und die unteren Grenzen der zweiseitigen 95%-Konfidenzintervalle) für die Antikörperfärbung von Klon 4B5 im BenchMark ULTRA-Gerät gegenüber dem BenchMark XT-Gerät betragen, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), 91,6 % (85,9), 91,2 % (85,3) und 94,9 % (89,3) für die Ausleser A, B bzw. C. Die NPA-Raten (und die unteren Grenzen der zweiseitigen 95%-Konfidenzintervalle) für die Antikörperfärbung von Klon 4B5 im BenchMark ULTRA-Gerät gegenüber dem BenchMark XT-Gerät waren basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ) 91,9 % (85,8), 93,8 % (88,3) und 99,3 % (96,3) für die Ausleser A, B bzw. C. Die OPA zwischen der Färbung mit dem Klon 4B5 mit Hilfe des BenchMark ULTRA-Geräts gegenüber dem BenchMark XT-Gerät betrug, basierend auf der 2x2-Analyse der klinischen Bewertung (positiv, negativ), 91,8 %, 92,5 % und 97,4 % für die Ausleser A, B bzw. C. Die 3x3-Darstellung der Inter-Plattform-Übereinstimmungsrate für jeden einzelnen Ausleser sind basierend auf der klinischen Wertung (0/1+, 2+, 3+) in den nachfolgenden Tabellen dargestellt:

**Tabelle 20.** 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmungsrate – Ausleser A – beim BenchMark ULTRA-Gerät im Vergleich zum BenchMark XT-Gerät.

BenchMark ULTRA-Gerät	BenchMark XT-Gerät			
Ausleser 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:		226/267 (84,6) (79,8-88,5)		
n/N (%) (95 % KI)				

**Tabelle 21.** 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmungsrate – Ausleser B – beim BenchMark ULTRA-Gerät im Vergleich zum BenchMark XT-Gerät.

BenchMark ULTRA-Gerät	BenchMark XT-Gerät			
Ausleser 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:		242/267 (90,6) (86,5-93,6)		
n/N (%) (95 % KI)				

**Tabelle 22.** 3x3-Analyse der Inter-Plattform-Übereinstimmungsrate – Ausleser C – beim BenchMark ULTRA-Gerät im Vergleich zum BenchMark XT-Gerät.

BenchMark ULTRA-Gerät	BenchMark XT-Gerät			
Ausleser 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:		257/267 (96,3) (93,2-98,0)		
n/N (%) (95 % KI)				

**12. Inter-Pathologen-Reproduzierbarkeit der Proben in Plattformvergleichsstudien:**

Positive und negative Übereinstimmungsrate mit zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen der Werte wurden für die sechs möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den Auslesern für jede Plattform berechnet.

Für das BenchMark ULTRA-Gerät betragen die PPA-Raten für die Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B 94,7 % (126/133), 98,2 % (111/113), 98,2 % (111/113), 89,4 % (126/141), 78,7 % (111/141) bzw. 83,5 % (111/133). Die NPA-Raten für die Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B betragen 88,8 % (119/134), 80,5 % (124/154), 85,7 % (132/154), 94,4 % (119/126), 98,4 % (124/126) und 98,5 % (132/134). Am höchsten war die OPA-Rate zwischen Ausleser A und Ausleser B (91,8 %), niedriger zwischen Ausleser B und Ausleser C (91,0 %) sowie Ausleser A und Ausleser C (88,8 %).

Für das BenchMark XT-Gerät betragen die PPA-Raten für die Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B 94,9 % (130/137), 98,3 % (116/118), 98,3 % (116/118), 90,9 % (130/143), 81,1 % (116/143) bzw. 84,7 % (116/137). Die NPA-Raten für Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B betragen 90,0 % (117/130), 81,9 % (122/149), 85,9 % (128/149), 94,4 % (117/124), 98,4 % (122/124) beziehungsweise 98,5 % (128/130). Am höchsten war die OPA-Rate zwischen Ausleser A und Ausleser B (92,5 %), niedriger zwischen Ausleser B und Ausleser C (91,4 %) sowie Ausleser A und Ausleser C (89,1 %).

**13. Vergleichsstudie mit dem MIEW DAB Detection Kit und dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit:**

Die Kohorte für Einrichtung 1 mit formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 140 Fällen invasiver Mammakarzinome [ungefähr 35 Fälle aus jeder HER-2-Klassifikationskategorie (0, 1+, 2+, 3+)] wurde in einer Vergleichsstudie mit dem MIEW DAB Detection Kit und dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit bei der Färbung mit Klon 4B5 im BenchMark ULTRA-Färbautomaten verwendet. Ein färbendes Labor und drei ablesende Einrichtungen in den Vereinigten Staaten nahmen an der Nachweis-Vergleichsstudie teil. Für die Antikörperfärbung mit Klon 4B5 im BenchMark ULTRA-Gerät lagen die PPA-Raten der Ergebnisse, die mit den Methoden des MIEW DAB Detection Kit und des *ultraView* Universal DAB Detection Kit erhalten wurden, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), bei 95,8 % (68/71), 96,9 % (63/65) und 96,5 % (55/57) für die Ausleser A, B bzw. C, und die NPA-Raten der Nachweismethoden bei 90,8 % (59/65), 91,5 % (65/71) und 97,5 % (77/79) für die Ausleser A, B bzw. C. Die OPA-Raten zwischen den Detektionskits betragen 93,4 % (127/136), 94,1 % (128/136) und 97,1 % (132/136) für die Ausleser A, B bzw. C. Die 3x3-Darstellung der Übereinstimmungsrate des Nachweisvergleichs für jeden einzelnen Ausleser sind, basierend auf den klinischen Scores (0/1+, 2+, 3+), in den nachfolgenden Tabellen dargestellt:

**Tabelle 23.** Ausleser A, Übereinstimmungsrate für MIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 3x3-Analyse – Klon 4B5, Färbung auf dem BenchMark ULTRA-Gerät.

MIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Ausleser 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:		119/136 (87,5) (80,9-92,0)		
n/N (%) (95 % KI)				

**Tabelle 24.** Ausleser B, Übereinstimmungsrate für MIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 3x3-Analyse – Klon 4B5, Färbung auf dem BenchMark ULTRA-Gerät.

MIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Ausleser 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:		128/136 (94,1) (88,8-97,0)		
n/N (%) (95 % KI)				

**Tabelle 25.** Ausleser C, Übereinstimmungsraten für MIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 3x3-Analyse – Klon 4B5, Färbung auf dem BenchMark ULTRA-Gerät.

MIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Ausleser 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)	

**14. Inter-Pathologen-Reproduzierbarkeit der Proben in Nachweisvergleichsstudien:**

Positive und negative Übereinstimmungsraten mit zweiseitigen 95%-Konfidenzintervallen der Werte wurden für die sechs möglichen paarweisen Vergleiche zwischen den Auslesern für jede Methode berechnet.

Für das MIEW DAB Detection Kit-Gerät betragen die PPA-Raten für die Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B 100,0 % (69/69), 98,2 % (56/57), 96,5 % (55/57), 93,2 % (69/74), 75,7 % (56/74) bzw. 79,7 % (55/69). Die NPA-Raten für Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B betragen 92,5 % (62/67), 77,2 % (61/79), 82,3 % (65/79), 100,0 % (62/62), 98,4 % (61/62) und 97,0 % (65/67). Am höchsten war die Gesamtübereinstimmungsrate zwischen Ausleser A und Ausleser B (96,3 %), niedriger zwischen Ausleser A und Ausleser C (86,0 %) sowie Ausleser B und Ausleser C (88,2 %).

Für das *ultraView* Universal DAB Detection Kit-Gerät, betragen die PPA-Raten für Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B 96,9 % (63/65), 98,2 % (56/57), 98,2 % (56/57), 88,7 % (63/71), 78,9 % (56/71) beziehungsweise 86,2 % (56/65). Die NPA-Raten für Ausleser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A und C vs. B betragen 88,7 % (63/71), 81,0 % (64/79), 88,6 % (70/79), 96,9 % (63/65), 98,5 % (64/65) beziehungsweise 98,6 % (70/71). Die Gesamtübereinstimmungsraten waren für jedes Paar von Auslesern ähnlich, 92,6 % (126/136), 88,2 % (120/136) und 92,6 % (126/136) für Ausleser A vs. B, Ausleser A vs. C beziehungsweise Ausleser B vs. C.

**LEISTUNGSMERKMALE BEI MAGENKREBSFÄLLEN**

- Die Inter-Lauf-Wiederholbarkeit des Geräts BenchMark XT wurde in fünf Durchläufen über fünf (nicht aufeinander folgende) Tage durchgeführt. Fünf Objektträger, die Magengewebe von drei Fällen mit Werten von 0, 1+, 2+ und 3+ der HER2-Exprimierung enthielten, zeigten 100 % Übereinstimmung innerhalb des positiven bzw. negativen Werts für jedes Gewebe.
- Die Intra-Lauf-Wiederholbarkeit im Gerät BenchMark XT wurde mit 28 Objektträgern durchgeführt, die Magengewebe von drei Fällen mit Werten von 0, 1+, 2+ und 3+ für die HER2-Exprimierung enthielten. Alle Fälle wurden innerhalb des positiven bzw. negativen Werts für den jeweiligen Gewebetyp äquivalent bewertet.

Die Intra-Plattform-Wiederholbarkeit wurde über drei BenchMark XT-Geräte hinweg durchgeführt. Bei diesen Läufen wurden alle 30 Objektträger aus jeweils zwei verschiedenen Multi-Gewebelöcken, die Magengewebe von drei Fällen mit den Werten 0, 1+, 2+ und 3+ für die HER2-Exprimierung enthielten, mit dem positiven bzw. negativen Wert für jeden Gewebetyp äquivalent bewertet.

Die Intra-Plattform-Wiederholbarkeit wurde über drei BenchMark ULTRA-Geräte hinweg durchgeführt. In diesen Läufen wurden alle 15 Objektträger von einem Multi-Gewebelock mit dem positiven bzw. negativen Wert für jeden Gewebetyp äquivalent bewertet.

Die Inter-Plattform-Wiederholbarkeit wurde über drei BenchMark XT-Geräte und drei BenchMark ULTRA-Geräte hinweg durchgeführt. In diesen Läufen wurden alle 30 Objektträger von einem Multi-Gewebelock mit dem positiven bzw. negativen Wert für jeden Gewebetyp äquivalent bewertet.

**3. Vergleich des MIEW DAB Detection Kit und des *ultraView* Universal DAB Detection Kit anhand von Magenkrebsfällen:**

Klon 4B5 wurde zur Durchführung von Vergleichstests mit den Detektionskits MIEW DAB Detection Kit und *ultraView* Universal DAB Detection Kit auf zwei Geräten (BenchMark XT-Gerät und BenchMark ULTRA-Gerät) verwendet. 210 Gewebefälle wurden in diesem Test verwendet. Die gefärbten Objektträger wurden in Hinblick auf positive und negative klinische Wertung ausgewertet.

Die Morphologie- und Hintergrundakzeptanzrate lagen bei 100 % sowohl für die Detektionskits als auch die Geräte. Direkte Vergleiche für positive und negative klinische Bewertung zwischen diesen Detektionskits sind für jedes Gerät in den folgenden Tabellen dargestellt.

**Tabelle 26.** Klinische Bewertung für das *ultraView* Universal DAB Detection Kit im Vergleich zum MIEW DAB Detection Kit auf dem BenchMark XT-Gerät.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	MIEW DAB Detection Kit		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	21	0	21
Negativ	0	189	189
Gesamt	21	189	210
	n/N	%	
Positive Übereinstimmung in Prozent	21/21	100	
Negative Übereinstimmung in Prozent	189/189	100	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	210/210	100	

**Tabelle 27.** Klinischer Bewertungsvergleich mit den Färbepattformen BenchMark XT und BenchMark ULTRA unter Verwendung des *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT Färbepattform mit <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA Färbepattform mit <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	20	1	21
Negativ	0	189	189
Gesamt	20	190	210
	n/N	% (95 % KI)	
Positive Übereinstimmung in Prozent	20/20	100 (83,9-100)	
Negative Übereinstimmung in Prozent	189/190	99,5 (97,1-99,9)	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	209/210	99,5 (97,4-99,9)	

**4. Vergleich von Klon 4B5 mit HercepTest bei humanem Magenkrebs:**

Eine verblindete externe Studie wurde durchgeführt, um die Färberegebnisse von Klon 4B5 im Gerät BenchMark XT mit dem des Dako HercepTest zu vergleichen. Ungefähr 239 Fälle von Magenkrebs wurden für diese Studie zusammen mit 159 Fällen des TARGOS-Labors getestet, und zwar aus der ToGA-Studie, die den HER2-Status und das klinische Ergebnis bei Patienten untersuchte, die mit Herceptin behandelt wurden. Das Labor färbte die Präparate der Fälle mit dem Klon 4B5 und dem HercepTest. Ein Pathologe bewertete die Fälle auf einer Skala von 0/1+, 2+ und 3+. Die positiven Fälle bestehen aus den Scores 2+ und 3+, während negative Fälle die Scores 0 und 1+ haben.

Die Tabellen 28 und 29 enthalten die Raten der Übereinstimmung zwischen dem Klon 4B5 und dem HercepTest, unterteilt nach Gewebepartikeln. Tabelle 28 vergleicht positive und negative Ergebnisse, wohingegen Tabelle 29 eine IHC-Skala mit den 3 Kategorien 0/1+, 2+ und 3+ verwendet. Die Gesamtübereinstimmung für alle Gewebe in Tabelle 28 und 29 beträgt 91,0 % bzw. 95,3 %.

**Tabelle 28.** Die prozentuale Übereinstimmung und das 95%-Konfidenzintervall für den Klon 4B5 (IHC) im Vergleich zum HercepTest wurden nach Gewebequelle unterteilt. Beide IHC-Tests wurden positiv vs. negativ (0/1+ und 2+/3+) bewertet.

n	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (95 % KI)	n	Prozentuale positive Übereinstimmung (95 % KI)	n	Prozentuale negative Übereinstimmung (95 % KI)
362/398	91,0 (87,7-93,4)	46/56	82,1 (70,2-90,0)	316/342	92,4 (89,1-94,8)

**Tabelle 29.** Die prozentuale Gesamtübereinstimmung und das 95%-Konfidenzintervall für den Klon 4B5 (IHC) und den HercepTest wurden nach Gewebequelle unterteilt. Die IHC-Tests wurden mit 0/1+, 2+ oder 3+ bewertet.

Gewebequelle	n	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (95 % KI)
TMA & ToGA	355/398	89,2 (85,8-91,9)

5. Inter-Labor-Reproduzierbarkeit den Klons 4B5: Die Studie wurde an drei Teststandorten durchgeführt. Die Proben wurden für die Einbeziehung in die Studie basierend auf dem klinischen IHC-Wert von Klon 4B5 ausgewählt, so dass es eine etwa gleich große Anzahl an positiven (3+) und negativen (0, 1+) Fällen gab. Zusätzlich wurden bis zu vier Fälle untersucht, die mit Magenkrebs des Scores 2+ qualifiziert waren.

In allen drei Einrichtungen wurde jeweils eine BenchMark XT-Plattform und eine BenchMark ULTRA-Plattform zur Durchführung von vier Färbeläufen pro Plattform verwendet. Die Fälle wurden zum Färben mit Hilfe eines gestaffelten Randomisierungsverfahrens randomisiert, so dass die Fälle, die einem Lauf zugeordnet wurden, alle Bewertungskategorien für HER2 bei Magenkrebs enthielten. Die Läufe auf den einzelnen Geräten in jeder Einrichtung enthielten die gleichen Fälle. In jeder Einrichtung wurde ein Objektträger pro Fall mit dem Klon 4B5 und ein anderer desselben Falls mit CONFIRM Negative Control Rabbit Ig auf der BenchMark ULTRA-Plattform gefärbt. Darüber hinaus wurde in jeder Einrichtung ein zweites Paar Objektträger desselben Falls auf der BenchMark XT-Plattform gefärbt. Die Fallobjektträger wurde in jeder Einrichtung von einem qualifizierten Ausleser bewertet, der gegenüber den zuvor bestimmten klinischen IHC-Scores für die einzelnen Proben verblindet worden war.

Die Gesamtübereinstimmung lag für alle auswertbaren Fälle und alle drei Vergleiche zwischen Einrichtungen sowohl bei der Plattform BenchMark ULTRA als auch der Plattform BenchMark XT bei 100 %. Die Gesamtübereinstimmung zwischen der BenchMark ULTRA-Plattform und der BenchMark XT-Plattform lag für die auswertbaren Fälle in den drei Einrichtungen bei 100 %. Die Hintergrund- und Morphologie-Akzeptanzraten lagen bei 100 % für die beiden Plattformen in den Einrichtungen A und C und > 95 % für beide Plattformen in der Einrichtung B. Siehe nachfolgende Tabellen.

**Tabelle 30.** Gesamtübereinstimmung der klinischen Bewertung zwischen den Einrichtungen: Alle auswertbaren Fälle.

BenchMark ULTRA-Gerät	Prozentuale Gesamtübereinstimmung
Vergleich zwischen Einrichtung A und Einrichtung B: n/N (%) (95 % KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
Vergleich zwischen Einrichtung A und Einrichtung C: n/N (%) (95 % KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
Vergleich zwischen Einrichtung B und Einrichtung C: n/N (%) (95 % KI)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
BenchMark XT-Gerät	Prozentuale Gesamtübereinstimmung
Vergleich zwischen Einrichtung A und Einrichtung B: n/N (%) (95 % KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
Vergleich zwischen Einrichtung A und Einrichtung C: n/N (%) (95 % KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
Vergleich zwischen Einrichtung B und Einrichtung C: n/N (%) (95 % KI)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)

**Tabelle 31.** Gesamtübereinstimmung der klinischen Bewertung zwischen den Plattformen: Alle auswertbaren Fälle.

BenchMark ULTRA-Gerät im Vergleich zum 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 32.** Hintergrundfärbungs- und Morphologie-Akzeptanzraten: Alle Fälle.

BenchMark ULTRA-Gerät	Einrichtung A	Einrichtung B	Einrichtung C
Morphologie-Akzeptanzraten	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Hintergrund-Akzeptanzraten	44/44 (100%)	42/44 (95,5%)	44/44 (100%)
BenchMark XT-Gerät	Einrichtung A	Einrichtung B	Einrichtung C
Morphologie-Akzeptanzraten	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Hintergrund-Akzeptanzraten	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)

6. **Studie zum Vergleich der BenchMark-Färbepattform und der BenchMark GX-Färbepattform mit der BenchMark XT-Färbepattform:**

Objektträger aus drei TMAs mit formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von Magenkarzinomen [ungefähr 50 Fälle pro TMA] wurde im BenchMark XT-Gerät, BenchMark-Gerät und BenchMark GX-Gerät gefärbt. Dazu wurde jeweils das empfohlene Färbeprotokoll für das *ultraView* Universal DAB Detection Kit und das *MIEW* DAB Detection Kit verwendet. Die Kontrollen umfassten PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides und einen zweiten Objektträger jedes TMA, der mit einem negativen Ig-Reagenz gefärbt war. Die gefärbten Objektträger wurden von einem Ausleser (Pathologen) bewertet.

Die Gesamtübereinstimmungsrate (und die untere Grenze der zweiseitigen 95%-Konfidenzintervalle) für die Antikörperfärbung von Klon 4B5 lauteten, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), wie folgt: BenchMark-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,0 % (94,2 – 99,3), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97,4 % (93,6 – 99,0), BenchMark-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *MIEW* DAB Detection Kit 96,6 % (92,7 – 98,4), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *MIEW* DAB Detection Kit 95,9 % (91,8 – 98,0).

Die positiven Übereinstimmungsrate (und die untere Grenze der zweiseitigen 95%-Konfidenzintervalle) für die Antikörperfärbung von Klon 4B5 lauteten, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), wie folgt: BenchMark-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91,7 % (64,4 – 98,5), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78,6 % (52,4 – 92,4), BenchMark-Gerät versus BenchMark XT mit *MIEW* DAB Detection Kit 80,0 % (54,8 – 93,0), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT mit *MIEW* DAB Detection Kit 73,3 % (48,0 – 89,1).

Die negativen Übereinstimmungsrate (und die untere Grenze der zweiseitigen 95%-Konfidenzintervalle) für die Antikörperfärbung von Klon 4B5 lauteten, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), wie folgt: BenchMark-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,5 % (94,8 – 99,6), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99,3 % (96,1 – 99,9), BenchMark-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *MIEW* DAB Detection Kit 98,1 % (94,6 – 99,4), BenchMark GX-Gerät versus BenchMark XT-Gerät mit *MIEW* DAB Detection Kit 98,1 % (94,5 – 99,3). Die 2x2-Darstellung der Übereinstimmungsrate für jeden Vergleich sind, basierend auf der klinischen Bewertung (positiv, negativ), in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 33.** BenchMark-Gerät vs. BenchMark XT-Gerät, Inter-Plattform-Übereinstimmungsraten mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 2x2-Analyse.

Klon 4B5 mit dem <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark-Gerät	BenchMark XT-Gerät		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	11	2	13
Negativ	1	133	134
Gesamt	12	135	147
	n/N	% (95 % KI)	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	144/147	98,0% (94,2-99,3)	
Positive Übereinstimmung in Prozent	11/12	91,7% (64,6-98,5)	
Negative Übereinstimmung in Prozent	133/135	98,5% (94,8-99,6)	

**Tabelle 34.** BenchMark GX-Gerät vs. BenchMark XT-Gerät, Inter-Plattform-Übereinstimmungsraten mit dem *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 2x2-Analyse.

Klon 4B5 mit dem <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX -Gerät	BenchMark XT-Gerät		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	11	1	12
Negativ	3	140	143
Gesamt	14	141	155
	n/N	% (95 % KI)	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	151/155	97,4% (93,6-99,0)	
Positive Übereinstimmung in Prozent	11/14	78,6% (52,4-92,4)	
Negative Übereinstimmung in Prozent	140/141	99,3% (96,1-99,9)	

**Tabelle 35.** BenchMark-Gerät vs. BenchMark XT-Gerät, Inter-Plattform-Übereinstimmungsraten mit dem *MIEW* DAB Detection Kit, 2x2-Analyse.

Klon 4B5 mit dem <i>MIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark-Gerät	BenchMark XT-Gerät		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	12	3	15
Negativ	3	156	159
Gesamt	15	159	174
	n/N	% (95 % KI)	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	168/174	96,6% (92,7-98,4)	
Positive Übereinstimmung in Prozent	12/15	80,0% (54,8-93,0)	
Negative Übereinstimmung in Prozent	156/159	98,1% (94,6-99,4)	

**Tabelle 36.** BenchMark GX-Gerät vs. BenchMark XT-Gerät, Inter-Plattform-Übereinstimmungsraten mit dem *MIEW* DAB Detection Kit, 2x2-Analyse.

Klon 4B5 mit dem <i>MIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark GX-Gerät	BenchMark XT-Gerät		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	11	3	14
Negativ	4	154	158
Gesamt	15	157	172
	n/N	% (95 % KI)	
Gesamtübereinstimmung in Prozent	165/172	95,9% (91,8-98,0)	
Positive Übereinstimmung in Prozent	11/15	73,3% (48,0-89,1)	
Negative Übereinstimmung in Prozent	154/157	98,1% (94,5-99,3)	

**Schlussfolgerung:** Die Daten aus diesen Studien weisen darauf hin, dass VENTANA HER2 (4B5) bei der ordnungsgemäßen Färbung von neoplastischen Brust- und Magengewebe spezifisch und reproduzierbar war. Die Methodenvergleichs- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeitsdaten zeigten, dass VENTANA HER2 (4B5) als Hilfsmittel bei der Bewertung von Brust- und Magenkrebspatienten indiziert ist, für die eine Herceptin-Behandlung in Betracht gezogen wird.

#### LEISTUNGSMERKMALE – PERJETA UND KADCYLA

##### HER2 Breast – Methodenvergleichsstudie zum Aufnahmetest für eine Studie zur Anwendung von Perjeta und Kadcyla bei Mammakarzinomen

Die Äquivalenz zu Aufnahmetests für Kohorten von Perjeta- und Kadcyla-Studien wurde durch Färben von Prüfproben mit dem VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody-Test ermittelt. Mit VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) wurden 2753 Proben gefärbt, die für eine Perjeta-Studie ausgewertet wurden, und 99 Proben, die für eine Kadcyla-Studie ausgewertet wurden. *Ermittelt wurden die Raten für die prozentuale positive (PPA), negative (NPA) und Gesamtübereinstimmung (OPA).* Das 95% KI (zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall) wurde mit der Score-Methode berechnet.

**Tabelle 37.** Übereinstimmung des Klon 4B5 und der Dako Assays in Bezug auf den HER2-Status bei allen HER2-auswertbaren Probanden. IHC-auswertbare Probanden haben einen HER2-Status von „Positiv“ oder „Negativ“, der sowohl mit dem Klon 4B5 als auch mit dem IHC-Aufnahmeassay nachgewiesen wurde.

Studie	Klon 4B5-Score [b]	DAKO HER2-Status [a] [b]		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Perjeta und Kadcyła	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Gesamt	2558	272	2830
	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) n/N (%) (95 % KI)	2380/2558 (93,0) (92,0-94,0)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) n/N (%) (95 % KI)	257/272 (94,5) (91,1-96,6)		
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)	2637/2830 (93,2) (92,2-94,1)		

[a] Positiv = IHC-positiv 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 38.** Übereinstimmung von Klon 4B5 und Dako Assays in Bezug auf den IHC-Status für alle IHC-auswertbaren Probanden. IHC-auswertbare Probanden haben einen HER2-Status von „Positiv“ oder „Negativ“, der sowohl mit dem Klon 4B5 als auch mit dem IHC-Aufnahmeassay nachgewiesen wurde.

Studie	Klon 4B5-Status [a]	Dako HercepTest-Status [a]		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Perjeta und Kadcyła	Positiv	2330	65	2395
	Negativ	21	414	435
	Gesamt	2351	479	2830
	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) n/N (%) (95 % KI)	2330/2351 (99,1) (98,6-99,4)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) n/N (%) (95 % KI)	414/479 (86,4) (83,1-89,2)		
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)	2744/2830 (97,0) (96,3-97,5)		
	Perjeta	Positiv	2267	63
Negativ		10	399	409
Gesamt		2277	462	2739
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) n/N (%) (95 % KI)		2267/2277 (99,6) (99,2-99,8)		
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) n/N (%) (95 % KI)		399/462 (86,4) (82,9-89,2)		
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)		2666/2739 (97,3) (96,7-97,9)		
Kadcyła		Positiv	63	2
	Negativ	11	15	26
	Gesamt	74	17	91
	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) n/N (%) (95 % KI)	63/74 (85,1) (75,3-91,5)		
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) n/N (%) (95 % KI)	15/17 (88,2) (65,7-96,7)		
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)	78/91 (85,7) (77,1-91,5)		

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

**Tabelle 39.** Übereinstimmung von Klon 4B5 und Dako Assays in Bezug auf den IHC-Score für alle IHC-auswertbaren Probanden. IHC-auswertbare Probanden haben einen HER2-Status von „Positiv“ oder „Negativ“, der sowohl mit dem Klon 4B5 als auch mit dem IHC-Aufnahmeassay nachgewiesen wurde.

Studie	Klon 4B5-Score	Dako HercepTest-Score			Gesamt
		3+	2+	0/1+	
Perjeta und Kadcylla	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Gesamt	2351	325	154	2830
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) 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
	Gesamt	2277	312	150	2739
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)	2629/2739 (96,0) (95,2-96,7)			
Kadcylla	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Gesamt	74	13	4	91
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) n/N (%) (95 % KI)	74/91 (81,3) (72,1-88,0)			

**Tabelle 40.** Klon 4B5-Färbeakzeptanz. IHC-getestete Probanden. Die IHC-Färbung gilt als akzeptabel, wenn ein gültiger IHC-Score (0, 1+, 2+ oder 3+) ermittelt werden konnte. Zu den Gründen für eine inakzeptable Färbung gehören eine inakzeptable negative Kontrolle, Gewebeverlust, unzureichendes Tumormaterial, inakzeptabler Hintergrund und inakzeptable Morphologie.

Parameter	Perjeta	Kadcylla	Perjeta und Kadcylla
Anzahl anfänglicher 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 IHC-Wiederholungstests	40	0	40
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)

## MÖGLICHE FEHLERURSACHEN UND IHRE BEHEBUNG

1. Wenn bei der Positivkontrolle eine zu schwache Färbung auftritt, müssen andere Positivkontrollen desselben Laufs überprüft werden, um festzustellen, ob es an dem Primäranantikörper oder an einem der üblichen Sekundärreagenzien liegt.
2. Falls die positive Kontrolle negativ ist, sollte sie überprüft werden, um sicherzugehen, dass der Objektträger das korrekte Barcode-Etikett aufweist. Wenn der Objektträger richtig etikettiert ist, müssen andere Positivkontrollen desselben Färbelaufs geprüft werden, um festzustellen, ob es an dem Primäranantikörper oder an einem der üblichen Sekundärreagenzien liegt. Gewebe können unsachgemäß gewonnen, fixiert oder entparaffiniert worden sein. Entnahme, Aufbewahrung und Fixierung der Gewebeproben müssen sachgemäß ausgeführt werden.
3. Wenn das Paraffin nicht vollständig entfernt wurde, kann die Färbung ausbleiben. Das Entparaffinierungsverfahren sollte in diesem Fall wiederholt werden.
4. Bei zu intensiver Antikörperfärbung den Lauf mit gekürzter Inkubationsdauer wiederholen, bis die gewünschte Färbintensität erreicht ist.
5. Wenn die Gewebeschnitte vom Objektträger abfließen, Objektträger prüfen, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind.
6. Wenn eine Zellkern- oder Zytoplasmafärbung in gesundem Schleimhautgewebe in direkter Nähe des Tumorbereichs des Magenkarzinoms vorliegt und die Interpretation der Membranfärbung beeinträchtigt, kann dieser Fall mit ISH getestet werden.
7. Hinweise zur Fehlerbehebung sind im Abschnitt „Verfahrensschritte“ und im Benutzerhandbuch des Färbeautomaten enthalten oder können beim zuständigen Kundenstvertreter erfragt werden.

## LITERATUR

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. Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
4. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
5. Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000278/WC500074922.pdf](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.
6. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69: 57-58.
7. Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*. 1997;75: 667-1673.
8. Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 1990;161:15-25.
9. Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. *Eur J Cancer*. 1993;29A:1018-1023.
10. 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.
11. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
12. 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.
13. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
14. 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.
15. Hoffmann M, et al. *Histopathology*. 2008;52:797-805.
16. Rüschoff J, Diel 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.
17. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66(4):194-199.
18. 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.
19. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
20. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
21. 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.
22. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*. 1994;47:816-22.
23. 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.
24. Rhodes A, Sarson J, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(4): 621-32.
25. van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2 status in breast cancer. *Mod Pathol*. 2009;22(7):879-886.
26. Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neu Test 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Virchows Arch*. 2009;454(3):241-8 (Epub: 24 Jan 2009).
27. Itoh H, Kato N, Serizawa A, Itoh T, Umemura S, Osamura RY. HER2 Rabbit Monoclonal Antibody 4B5 and Silver SISH: High Performance in Surgical Pathology for Appropriate Patient Care. *Laboratory Investigation*. 2009;89(1): 48A.
28. Powell WC, Roche PC, Tubbs RR. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(6):569.
29. Carbone A, Botti G, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver *in situ* hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn*. 2008;10(6): 527-36.
30. Wolff AC, Hammond ME, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18.
31. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
32. 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.
33. 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.
34. <http://www.kadcyla.com/hcp>
35. <http://www.perjeta.com/hcp>

**GESCHÜTZTE MARKENNAMEN**

BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView*, PATHWAY, VENTANA und das VENTANA-Logo sind Marken von Roche.

Alle anderen Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

**KONTAKT**

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany



[www.ventana.com](http://www.ventana.com)