

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

REF 790-7167

09670564001

IVD 50

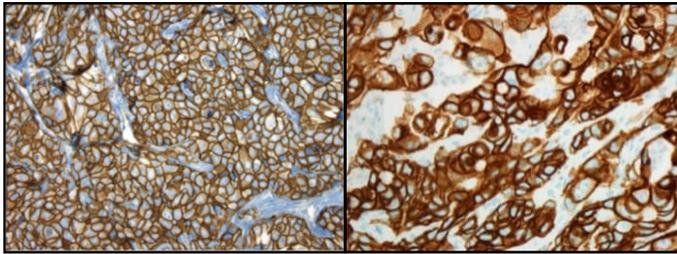


Figura 1. Colorazione con VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx nel carcinoma mammario.

Figura 2. Colorazione con VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx con punteggio 3+ nel carcinoma gastrico.

USO PREVISTO

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx è destinato alla rilevazione semi-quantitativa dell'antigene HER2 tramite immunocitochimica (IHC) in sezioni di tessuto mammario e gastrico fissato in formalina e incluso in paraffina a seguito della colorazione su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Questo dispositivo IHC è indicato come companion diagnostic per l'identificazione di pazienti con carcinoma mammario idonei al trattamento con trastuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/amplificato da ISH), pertuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/amplificato da ISH), trastuzumab emtansine (IHC 3+ o IHC 2+/amplificato da ISH) o trastuzumab deruxtecan (IHC 1+ o IHC 2+/non amplificato da ISH). Inoltre, questo dispositivo IHC è indicato come companion diagnostic per l'identificazione di pazienti con carcinoma gastrico per i quali viene preso in considerazione il trattamento con trastuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/ISH amplificato).

I risultati ottenuti tramite questo prodotto devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati. Questo anticorpo è indicato per uso diagnostico *in vitro* (IVD).

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (analisi VENTANA HER2 (4B5)) contiene un anticorpo monoclonale di coniglio (clone 4B5) diretto contro il dominio interno del recettore del fattore di crescita dell'epidermide umano 2 (HER2). HER2 è stato clonato e caratterizzato.¹ Il clone 4B5 ha dimostrato di reagire con una proteina di 185 kDa ottenuta da lisati di cellule SK-BR-3 tramite Western blot. SK-BR-3 è una linea cellulare di carcinoma mammario, che presenta una sovraespressione pari a un fattore 128 dell'mRNA di HER2.² Le dimensioni della banda identificata sono ben correlate a quelle segnalate per la proteina HER2 (185 kDa).¹ Esperimenti di immunocitochimica (IHC) eseguiti con linee cellulari trasfettate (HEK293) hanno dimostrato che il clone 4B5 colora le cellule trasfettate con HER2 e le cellule trasfettate con HER4, sebbene non sia stata osservata alcuna colorazione delle cellule trasfettate con HER1 o HER3, e anche i dati Western blot con la proteina ricombinante HER4 indicano che il clone 4B5 riconosce un epitopo HER4.³ Ciononostante, non sono state osservate reazioni crociate tra HER2 (4B5) e HER4 nella colorazione IHC di tessuto mammario fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE).⁴ HER2 è un recettore tirosin-chinasico transmembrana strutturalmente simile al recettore del fattore di crescita dell'epidermide.^{5,6} L'amplificazione del gene e la corrispondente sovraespressione di HER2 sono state riscontrate in una varietà di tumori, inclusi i carcinomi mammari.^{5,6,7} La sovraespressione della proteina, dovuta all'amplificazione del gene HER2, è il principale fattore della tumorigenesi mediata da HER2.⁵ L'amplificazione del gene comporta tipicamente un aumento significativo dei recettori HER2 a livello della membrana cellulare.^{5,6} La sovraespressione della proteina HER2 promuove la

trasduzione del segnale e determina la sovraregolazione dei processi di proliferazione e differenziazione, causando in ultima analisi la formazione del tumore.^{5,6}

Sono stati osservati vari livelli di espressione della proteina HER2 in assenza di amplificazione del gene.⁸ Sono stati proposti diversi fattori potenzialmente in grado di spiegare la presenza di livelli intermedi di espressione della proteina HER2 in casi di carcinoma mammario in assenza di amplificazione genica, tra cui il crosstalk tra le vie di segnalazione mediate da HER2 e dal recettore degli estrogeni.^{8,9} Un livello di espressione della proteina HER2 che non sia considerato sovraespressione può essere classificato come espressione bassa di HER2.^{8,10,11} La sovraespressione della proteina HER2 e/o l'amplificazione del gene si osservano nell'adenocarcinoma gastrico e della giunzione gastroesofagea.^{12,13,14} Negli studi pubblicati è stata riportata un'ampia gamma di frequenze di sovraespressione di HER2. Tuttavia, una delle più grandi serie di dati di screening che ha incluso 3803 pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico e della giunzione gastroesofagea ha riportato che il 22% dei pazienti risultava positivo per la sovraespressione della proteina HER2 o per l'amplificazione del relativo gene.¹⁵

SIGNIFICATO CLINICO

Il carcinoma mammario è il carcinoma più comunemente diagnosticato nelle donne di tutto il mondo.¹⁶ Una rilevazione precoce e la selezione di terapie adeguate può incidere in misura significativa sulla sopravvivenza globale.^{7,17} Una percentuale compresa tra circa il 15 e il 30% dei tumori invasivi della mammella è HER2 positiva.^{7,10} Quasi tutti i casi di malattia di Paget e fino al 90% dei casi di carcinoma duttale in situ di tipo comedo sono positivi.^{18,19} Lo stato HER2 positivo ha definito un sottogruppo di pazienti con carcinoma mammario che traggono beneficio dalla terapia mirata a HER2 da oltre 20 anni.^{7,17} La popolazione HER2 positiva è storicamente stata definita come la popolazione di pazienti che mostra una sovraespressione della proteina HER2 valutata mediante immunocitochimica (IHC) sulla base di un sistema di assegnazione del punteggio IHC semiquantitativo (0, 1+, 2+ e 3+) e/o un'amplificazione del gene valutata mediante ibridazione in-situ (ISH).¹⁷ La positività per HER2 è stata fortemente associata alla sovraespressione della proteina (punteggio IHC pari a 3+). Nei casi con sovraespressione borderline (punteggio IHC 2+, equivoco) può essere necessario un reflex test di conferma per valutare l'amplificazione del gene in base all'algoritmo consolidato di valutazione di HER2.¹⁷

Farmaci terapeutici presenti in commercio, tra cui Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) e KADCYLA (ado-trastuzumab emtansine/trastuzumab emtansine) hanno dimostrato un beneficio clinico in pazienti con carcinoma mammario HER2 positivo, grazie a un'azione di arresto, e in alcuni casi di inversione, della crescita tumorale.²⁰⁻²⁴ Trastuzumab e pertuzumab sono anticorpi monoclonali umanizzati che si legano alla proteina HER2 sulla superficie cellulare, alterando i meccanismi di trasduzione del segnale mediati da HER2.^{20,24,25} Trastuzumab emtansine è un coniugato anticorpo-farmaco, costituito da trastuzumab e dall'agente citotossico DM1 tra loro coniugati per mezzo di un linker non scindibile.²³ Solo i pazienti con carcinoma mammario HER2 positivo (punteggio IHC 3+ o 2+, con stato amplificato di HER2 confermato) dovrebbero trarre beneficio dal trattamento con trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA) o trastuzumab emtansine (KADCYLA).^{16,18}

Il 40-50% circa dei pazienti con carcinoma mammario presenta neoplasie che non dimostrano amplificazione del gene HER2 e non sovraesprimono il recettore: si riscontrano tuttavia bassi livelli di espressione di HER2.^{8,10} I casi con espressione bassa di HER2 (punteggio IHC 1+ o 2+ (con stato non amplificato di HER2 confermato)) sono in genere considerati HER2 negativi e sono esclusi dalle opzioni di trattamento mirate a HER2.⁸ Recentemente, è stato osservato un beneficio derivante dal trattamento anti-HER2 con trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) in pazienti con carcinoma mammario con espressione bassa di HER2.^{26,27} Trastuzumab deruxtecan è un coniugato anticorpo-farmaco che contiene una base di anticorpo monoclonale diretto contro HER2 (trastuzumab), un linker scindibile e un derivato dell'esatecano permeabile attraverso la membrana cellulare (un inibitore della topoisomerasi I che agisce da payload).¹⁰

La diagnostica *in vitro* per la valutazione dello stato HER2 in pazienti con carcinoma mammario è importante in quanto aiuta il medico nella determinazione della terapia con trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansine (KADCYLA) o trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®).¹⁷ La rilevazione tramite IHC dell'espressione della proteina HER2 viene utilizzata come ausilio nella valutazione di pazienti con carcinoma mammario per i quali viene presa in considerazione la terapia mirata a HER2 con trastuzumab (Herceptin), pertuzumab (PERJETA), trastuzumab emtansine (KADCYLA) o trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®).

Il carcinoma gastrico è il quinto tumore più comune, nonché una delle cause principali di morte correlata al cancro in tutto il mondo.¹³ L'intervento chirurgico è il trattamento più comunemente utilizzato per il carcinoma gastrico.^{14,28} Tuttavia, la maggior parte dei casi di

carcinoma gastrico viene identificata a uno stadio avanzato, quando il trattamento chirurgico è spesso difficile da attuare.^{14,28} Per il trattamento del carcinoma gastrico in stadio avanzato si ricorre alla chemioterapia, anche se la sopravvivenza dei pazienti è molto bassa.^{14,28} La terapia mirata a HER2 con trastuzumab è un caposaldo nella gestione del carcinoma mammario invasivo e ha un valore terapeutico nella gestione dei pazienti con carcinoma gastrico che sovraesprimono il recettore.^{12,14} La dimostrazione dell'amplificazione del gene *HER2* e/o della sovraespressione della proteina è essenziale per selezionare i pazienti idonei alla terapia con trastuzumab.^{12,14} Studi clinici hanno dimostrato che i pazienti con carcinoma mammario o gastrico con elevata sovraespressione della proteina HER2 e/o amplificazione del gene traggono beneficio soprattutto da trastuzumab.^{12,21} La rilevazione basata su tecniche di IHC dell'espressione della proteina HER2 viene impiegata quale ausilio nella valutazione dei pazienti con carcinoma gastrico per i quali viene preso in considerazione il trattamento con trastuzumab (Herceptin).

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

L'analisi VENTANA HER2 (4B5) contiene un anticorpo monoclonale di coniglio che si lega a HER2 in sezioni di tessuto FFPE. L'anticorpo specifico può essere individuato utilizzando un coniugato di anticorpo secondario e HRP (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). Il complesso anticorpo specifico-enzima viene quindi visualizzato tramite la precipitazione di un prodotto enzimatico di reazione. Ciascuna fase prevede l'incubazione per un preciso intervallo temporale e a una specifica temperatura. Al termine di ciascuna fase di incubazione, lo strumento lava le sezioni allo scopo di interrompere la reazione e rimuovere il materiale non legato che ostacolerebbe la reazione desiderata prevista per le fasi successive. Lo strumento applica inoltre un Liquid Coverslip, che minimizza l'evaporazione dei reagenti acquosi dal vetrino del campione.

I casi clinici devono essere valutati in un contesto che includa l'esecuzione dei controlli appropriati. Si consiglia di includere un tessuto di controllo positivo fissato e processato allo stesso modo del campione del paziente (ad esempio, un carcinoma mammario debolmente positivo). Oltre alla colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5), un secondo vetrino deve essere colorato con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Affinché il test possa essere considerato valido, il tessuto di controllo positivo deve presentare una colorazione di membrana delle cellule tumorali. Questi componenti devono essere negativi quando vengono colorati con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inoltre, si consiglia di includere un tessuto di controllo negativo (ad esempio, un carcinoma mammario o gastrico HER2 negativo) per ogni gruppo di campioni processati e analizzati su uno strumento BenchMark IHC/ISH. Questo tessuto di controllo negativo deve essere colorato con VENTANA HER2 (4B5) RxDx per accertarsi che il potenziamento dell'antigene e le altre procedure di pretrattamento non abbiano causato colorazioni false positive.

MATERIALI FORNITI

L'analisi VENTANA HER2 (4B5) contiene una quantità di reagente sufficiente per 50 test.

Un erogatore da 5 mL di VENTANA HER2 (4B5) contiene circa 30 µg di anticorpo monoclonale di coniglio diretto contro l'antigene HER2 umano.

L'anticorpo è diluito in soluzione salina tamponata Tris 0.05 M, EDTA 0.01 M, Brij-35 0.05% con proteina di trasporto 0.3% e azoturo di sodio 0.05% come conservante. Sono presenti tracce di siero fetale bovino, in misura pari a circa 0.25%, riconducibili alla soluzione madre.

La concentrazione dell'anticorpo specifico è di circa 6 µg/mL.

L'analisi VENTANA HER2 (4B5) contiene una IgG di coniglio diluita da surnatanti di coltura cellulare.

Fare riferimento all'opportuna scheda metodologica del kit di rilevazione VENTANA per le descrizioni dettagliate di quanto segue: Principio della procedura, Materiali e metodi, Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi, Procedure di controllo qualità, Risoluzione dei problemi, Interpretazione dei risultati e Limitazioni.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

I reagenti di colorazione, quali i kit di rilevazione VENTANA e i componenti ausiliari, compresi i vetrini dei tessuti di controllo positivi e negativi, non sono forniti.

È possibile che non tutti i prodotti elencati nella scheda metodologica siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.

I reagenti e materiali seguenti possono essere necessari per la colorazione ma non sono forniti:

1. Tessuto di controllo consigliato
2. Vetrini per microscopia, caricati positivamente
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n. di cat. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView* DAB Detection Kit (n. di cat. 760-500 / 05269806001)
5. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)

6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001)
8. ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001)
11. Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
13. Attrezzatura di laboratorio per uso generico
14. Strumento BenchMark IHC/ISH

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare.

Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità dell'anticorpo, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo dell'erogatore e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.

Su ogni erogatore di anticorpi è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il reagente resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza indicata.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti FFPE trattati normalmente sono idonei all'uso con questo anticorpo primario se usati con i kit di rilevazione VENTANA e gli strumenti BenchMark IHC/ISH. Il fissativo per i tessuti consigliato è formalina neutra tamponata al 10%.²⁹ I vetrini devono essere immediatamente colorati, poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate può diminuire con il passare del tempo.

Si consiglia di eseguire i controlli positivi e negativi contemporaneamente ai campioni sconosciuti.

Le sezioni vanno tagliate a uno spessore di circa 4 µm e montate su vetrini di vetro. I vetrini devono essere Superfrost Plus o equivalenti. Gli studi indicano che sezioni di tessuto e sezioni di linee cellulari tagliate e asciugate all'aria conservate a 2-8 °C sono stabili per un minimo di 45 giorni. Ogni laboratorio deve convalidare la stabilità delle sezioni montate su vetrino in base alle proprie procedure e condizioni ambientali di conservazione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (VD).
2. Solo per uso professionale.
3. Non usare oltre il numero di test specificato.
4. I vetrini caricati positivamente possono essere suscettibili a sollecitazioni ambientali con conseguente colorazione inadeguata. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo tipo di vetrini, contattare il rappresentante Roche.
5. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a rischio biologico e smaltiti adottando precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.^{30,31}
6. Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi e le membrane mucose. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante.
7. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché può causare risultati non corretti.
8. Se utilizzato secondo le istruzioni, questo prodotto non è classificato come sostanza pericolosa. Il conservante contenuto nel reagente è azoturo di sodio. I sintomi della sovraesposizione all'azoturo di sodio includono irritazione della cute e degli occhi e irritazione delle membrane mucose e del tratto respiratorio superiore. La concentrazione di azoturo di sodio in questo prodotto è pari a 0.05% e non soddisfa i criteri per le sostanze pericolose. L'accumulo di NaN₃ può reagire con le tubazioni in piombo e in rame e formare azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua per evitare l'accumulo di azoturi nelle tubazioni.³² Nei soggetti sensibili sono possibili reazioni allergiche sistemiche.
9. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento alla guida per l'utilizzatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle istruzioni per l'uso di tutti i componenti necessari disponibili sul sito navifyportal.roche.com.
10. Consultare le autorità locali e/o statali in relazione al metodo di smaltimento consigliato.
11. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.
12. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

PROCEDURA DI COLORAZIONE

Gli anticorpi primari VENTANA sono stati sviluppati per l'uso sugli strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento ai kit di rilevazione e agli accessori VENTANA. Fare riferimento alle tabelle seguenti per i protocolli di colorazione consigliati.

Questo anticorpo è stato ottimizzato per tempi di incubazione specifici; tuttavia, l'utilizzatore deve convalidare i risultati ottenuti con questo reagente.

È possibile visualizzare, stampare e modificare i parametri delle procedure automatizzate conformemente alla procedura descritta nella guida per l'utilizzatore dello strumento. Fare riferimento all'opportuna scheda metodologica di *ultraView* DAB Detection Kit per ulteriori dettagli sulle procedure di colorazione IHC.

Per ulteriori informazioni dettagliate sull'uso corretto di questo dispositivo, fare riferimento alla scheda metodologica dell'erogatore in linea associato al P/N 790-7167.

NOTA: le procedure di colorazione sono riassunte in Tabella 1 (per la valutazione della positività per HER2 e di espressione bassa di HER2 in casi di carcinoma mammario), in Tabella 2 (per la valutazione della sola positività per HER2 in casi di carcinoma mammario) e in Tabella 3 (per la valutazione della positività per HER2 in casi di carcinoma gastrico). Le fasi raccomandate del protocollo di colorazione, tra cui lo smascheramento dell'antigene e l'incubazione dell'anticorpo, sono le medesime per tutti gli screening di HER2 nel carcinoma mammario; tuttavia, le procedure di colorazione prevedono diversi livelli di alterazione da parte dell'utilizzatore. Quando si esegue lo screening di pazienti per la valutazione di un potenziale stato di espressione bassa di HER2, si deve utilizzare la procedura di colorazione indicata in Tabella 1. Se l'obiettivo include la refertazione di uno stato di espressione bassa di HER2 (definito come un punteggio IHC 1+ o 2+ (con stato non amplificato di HER2 confermato)), è necessario usare la procedura di colorazione indicata in Tabella 1. Se l'obiettivo include solo la refertazione di uno stato di positività per HER2 (definito come un punteggio IHC 3+ o 2+ (con stato amplificato di HER2 confermato)), è possibile usare le procedure indicate in Tabella 1 o Tabella 2. Per garantire un utilizzo completo dei risultati relativi allo stato di espressione bassa di HER2 o di positività per HER2 nei casi di carcinoma mammario, si consiglia fortemente di utilizzare la procedura di colorazione indicata in Tabella 1.

Procedura di colorazione per tutte le valutazioni di HER2, inclusa la valutazione del potenziale stato di espressione bassa di HER2 in campioni mammari

Il protocollo di colorazione e la procedura indicati in questa sezione e in Tabella 1 sono adeguati per tutti gli screening di HER2 in casi di carcinoma mammario e devono essere utilizzati nella valutazione dei campioni dei pazienti per stabilire l'idoneità di una terapia per potenziale espressione bassa di HER2. Una deviazione dal protocollo di colorazione raccomandato potrebbe produrre campioni colorati per HER2 non accettabili con punteggio HER2 alterato, specialmente nei casi con espressione bassa di HER2 (IHC 1+). In particolare, l'aumento o la riduzione dei tempi di smascheramento dell'antigene producono verosimilmente campioni colorati per HER2 con punteggi HER2 alterati, che potrebbero portare a decisioni terapeutiche inadeguate per i pazienti. Per mitigare tale rischio, la procedura di colorazione indicata in Tabella 1 non ammette l'alterazione dei tempi di smascheramento dell'antigene o dei tempi di incubazione dell'anticorpo, essendo l'unico protocollo di colorazione convalidato per l'uso nella valutazione di campioni con potenziale espressione bassa di HER2.

Tabella 1. Protocollo di colorazione per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) per tutte le valutazioni di HER2 in campioni mammari, inclusa la valutazione del potenziale stato di espressione bassa di HER2 su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Procedura di colorazione	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Anticorpo (primario)*	VENTANA HER2 4B5 Ab - 16 min oppure CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig - 16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab - 16 min oppure CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig - 16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab - 12 min oppure CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig - 12 min

Tipo di procedura	Metodo		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti		

* Si tratta di una condizione pre-programmata e non costituisce una fase selezionabile per l'utilizzatore.

Procedure di colorazione alternative applicabili solo per la valutazione della potenziale positività per HER2 in campioni mammari e gastrici

Le procedure e i protocolli di colorazione indicati in Tabella 2 e Tabella 3 sono destinati all'uso per la valutazione della positività per HER2 (definita come una sovraespressione della proteina, con punteggio IHC 3+ o 2+ (con stato amplificato di HER2 confermato)) e non per la valutazione dell'espressione bassa di HER2 (definita come un punteggio IHC di 1+ o 2+ (con stato non amplificato di HER2 confermato)). I tempi raccomandati di smascheramento dell'antigene e di incubazione dell'anticorpo indicati in dettaglio in Tabella 2 e Tabella 3 non sono vincolanti e possono essere alterati dall'utilizzatore. I possibili motivi per cui alterare i parametri includono variazioni della fissazione dei tessuti e dell'elaborazione (deviazione dalla fissazione o dall'elaborazione raccomandate dei campioni), dello strumento generico di laboratorio o delle condizioni ambientali e preferenze del patologo. Per ulteriori informazioni sulle variabili di fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry Principles and Advances".³³ Gli utilizzatori che modificano i protocolli di colorazione consigliati sono responsabili per l'interpretazione e la convalida dei risultati del paziente.

Tabella 2. Protocollo di colorazione consigliato per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con *ultraView* DAB Detection Kit in campioni mammari su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Procedura di colorazione	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB
Sparaffinatura	Selezionata	Selezionata	Selezionata
Cell Conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1, lieve	CC1, lieve	ULTRA CC1, lieve
Anticorpo (primario)	16 minuti, 37 °C	16 minuti, 37 °C	12 minuti, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Selezionata		
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti		

Tabella 3. Protocollo di colorazione consigliato per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con *ultraView* DAB Detection Kit in campioni gastrici su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo di procedura	Metodo		
	BenchMark GX	Benchmark XT	BenchMark ULTRA
Procedura di colorazione	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB	Procedura di colorazione <i>ultraView</i> DAB
Sparaffinatura	Selezionata	Selezionata	Selezionata

Tipo di procedura	Metodo		
	BenchMark GX	Benchmark XT	BenchMark ULTRA
Cell Conditioning (smascheramento dell'antigene)	CC1, lieve	CC1, lieve	ULTRA CC1, lieve
Anticorpo (primario)	16 minuti, 37 °C	16 minuti, 37 °C	12 minuti, 36 °C
ultraWash	Selezionata		
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti		
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti		

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Linee cellulari di controllo

Ventana mette a disposizione come prodotto separato quattro linee cellulari di controllo fissate in formalina, incluse in paraffina, tagliate e collocate su un singolo vetrino caricato. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (P/N 781-2991) può essere utile per una convalida preliminare dello strumento o del metodo di processazione usato per la colorazione dei vetrini con l'analisi VENTANA HER2 (4B5). Queste quattro linee cellulari di controllo sono caratterizzate tramite ibridazione *in situ* per il numero di copie geniche, Tabella 4. Se processazione e colorazione sono adeguate, le linee cellulari devono dare luogo a colorazione come descritto nella scheda metodologica PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Se la colorazione indicata non è evidente nelle sezioni opportune, in particolare per i controlli 1+ e 2+, la colorazione dei tessuti deve essere ripetuta.

Tabella 4. Caratteristiche di PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

Punteggio HER2 IHC	Linea cellulare	Rapporto HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* Il rapporto HER2/Chr17 è una media di tre lotti di PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides determinata tramite ibridazione *in situ* fluorescente (FISH).

TESSUTO DI CONTROLLO POSITIVO

Un tessuto di controllo positivo fissato e processato allo stesso modo dei campioni dei pazienti deve essere acquisito per ciascun gruppo di condizioni di test e con ogni procedura di colorazione eseguita con l'analisi VENTANA HER2 (4B5). La pratica di laboratorio ottimale consiste nell'includere una sezione di tessuto di controllo positivo sullo stesso vetrino del tessuto da testare. Ciò contribuisce all'identificazione di eventuali errori di applicazione dei reagenti al vetrino. Il tessuto con una colorazione positiva debole è il più adatto per il controllo qualità. Il tessuto di controllo può contenere elementi con colorazione positiva e negativa e fungere da controllo sia positivo che negativo. Il tessuto di controllo deve provenire da un campione autoptico, bioptico o chirurgico recente preparato o fissato il prima possibile in modo identico alle sezioni da testare.

Tale tessuto può consentire di controllare tutte le fasi dell'analisi, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione. L'uso di una sezione di tessuto fissata o processata diversamente rispetto al campione sottoposto a test serve come controllo per tutti i reagenti e le fasi del metodo, tranne che per la fissazione e la preparazione del tessuto. Idealmente, per assicurare che il sistema sia sensibile a lievi degradazioni dei reagenti o a problemi relativi alla metodologia IHC, deve essere scelto un tessuto noto per esibire una colorazione debole ma positiva. In genere, tuttavia, il tessuto neoplastico positivo a HER2 è fortemente positivo a causa della natura della patologia (sovraespressione).

I tessuti di controllo positivi noti devono essere utilizzati solo per il monitoraggio delle prestazioni di reagenti e strumenti, non come ausilio nella determinazione della diagnosi specifica dei campioni del test. Se i tessuti di controllo positivi non mostrano colorazione positiva, i risultati dei campioni del test devono essere considerati non validi.

Un esempio di controllo positivo per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) è un campione di carcinoma mammario invasivo debolmente positivo per HER2 noto o un campione di carcinoma gastrico debolmente positivo. I componenti del tessuto a colorazione positiva (colorazione di membrana delle cellule neoplastiche) sono utilizzati per confermare l'applicazione dell'anticorpo e il funzionamento corretto dello strumento.

Tessuto di controllo negativo

Lo stesso vetrino utilizzato per il tessuto di controllo positivo (carcinoma mammario invasivo duttale o lobulare o carcinoma gastrico) può essere utilizzato come tessuto di controllo negativo. I componenti che non danno luogo a colorazione (stroma circostante, cellule linfoidi e vasi sanguigni) devono dimostrare assenza di colorazione specifica e fornire un'indicazione della colorazione di fondo specifica (falsa positiva) con l'anticorpo primario. Utilizzare un tessuto negativo noto, fissato, processato e incluso in maniera identica a quella del campione del paziente.

Controllo negativo del reagente

Acquisire un controllo negativo del reagente per ogni campione come ausilio all'interpretazione dei risultati. Per valutare la colorazione non specifica, al posto dell'anticorpo primario si utilizza un controllo negativo del reagente. Il vetrino deve essere colorato con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Il periodo di incubazione del controllo negativo del reagente deve essere uguale al periodo di incubazione dell'anticorpo primario.

Discrepanze inspiegabili

Eventuali discrepanze inspiegabili nei controlli devono essere immediatamente riferite al rappresentante dell'assistenza locale. Se i risultati del controllo qualità non soddisfano le specifiche, i risultati dei pazienti non sono validi. Fare riferimento alla sezione Risoluzione dei problemi. Identificare e correggere il problema e ripetere quindi l'analisi dei campioni del paziente.

Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità dell'anticorpo effettuando il test su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali immunostochimiche note che rappresentino tessuti noti positivi e negativi (fare riferimento alle Procedure di controllo qualità precedentemente descritte in questa sezione del foglietto illustrativo e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,³⁴ o a CLSI Approved Guideline³⁵ oppure a entrambi i documenti). Ripetere queste procedure di controllo qualità per ciascun nuovo lotto di anticorpo od ogni volta che si modificano i parametri dell'analisi. I tessuti di carcinoma mammario e cancro gastrico aventi stato HER2 noto sono adatti per la verifica dell'analisi.

INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE/RISULTATI PREVISTI

La procedura di immunocolorazione automatizzata VENTANA provoca la precipitazione di un prodotto di reazione di colore marrone (DAB) in corrispondenza dei siti dell'antigene individuati dall'analisi VENTANA HER2 (4B5). Un patologo qualificato con esperienza nelle procedure immunostochimiche dovrà valutare i controlli e qualificare il prodotto colorato prima di interpretare i risultati.

Controlli positivi

Il tessuto di controllo positivo colorato deve essere esaminato per primo, per verificare che tutti i reagenti funzionino correttamente. La presenza di un prodotto di reazione colorato in maniera appropriata all'interno della membrana delle cellule target è indicativa di una reattività positiva. A seconda della durata del periodo di incubazione e della potenza dell'ematosilina utilizzata, la controcolorazione determina una colorazione dei nuclei cellulari da blu pallido a blu scuro. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

Se i tessuti di controllo positivi non si colorano positivamente, tutti i risultati ottenuti con i campioni del test devono essere considerati non validi.

Tessuti di controllo negativo

Il tessuto di controllo negativo deve essere esaminato dopo il tessuto di controllo positivo per verificare la marcatura specifica dell'antigene target da parte dell'anticorpo primario.

L'assenza di colorazione specifica nel tessuto di controllo negativo conferma l'assenza di cross-reattività dell'anticorpo alle cellule o ai componenti cellulari. Se il tessuto è sottoposto a controcolorazione, può essere presente colorazione intorno all'esterno della cellula, ossia negli spazi interstiziali. Se il tessuto di controllo negativo mostra una colorazione specifica, i risultati ottenuti con il campione del paziente devono essere considerati non validi.

Controlli negativi del reagente

Una colorazione non specifica, se presente, avrà un aspetto diffuso. È possibile osservare anche una lieve colorazione sporadica del tessuto connettivo in sezioni di tessuto fissate in formalina in misura eccessiva. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, prendere in considerazione cellule intatte, poiché spesso le cellule necrotiche o degradate assumono una colorazione non specifica.

Tessuto del paziente

I campioni del paziente devono essere esaminati per ultimi. L'intensità della colorazione positiva deve essere valutata tenendo in considerazione qualunque colorazione di fondo del controllo negativo del reagente. Come in qualsiasi altro test immunostochimico, un risultato negativo indica che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene è assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti al test. La morfologia di ogni campione di tessuto deve essere esaminata anche utilizzando una sezione colorata con ematossilina ed eosina quando si interpretano i risultati immunostochimici. I riscontri morfologici del paziente e i dati clinici pertinenti devono essere interpretati da un patologo qualificato.

Un patologo qualificato con esperienza nelle procedure immunostochimiche dovrà valutare i controlli positivi e negativi e qualificare il prodotto colorato prima di interpretare i risultati.

Convenzioni di assegnazione del punteggio per l'interpretazione di VENTANA anti-HER2 (4B5) Antibody nel carcinoma mammario

Le tabelle di seguito riportano i criteri di colorazione. Fare riferimento a VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx Guida all'interpretazione per il carcinoma mammario e gastrico (P/N 1021957IT) per una descrizione più dettagliata accompagnata da immagini della colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Tabella 5. Criteri di intensità e pattern della colorazione di membrana cellulare con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma mammario quando si utilizza la procedura di colorazione indicata in Tabella 1.

Pattern di colorazione	Punteggio HER2 (4B5) (segnalare al medico curante)	Utilizzo della procedura di colorazione in Tabella 1: stato di referizzazione consigliato	Applicazione clinica
Colorazione di membrana non osservata oppure colorazione parziale fievole della membrana, in misura pari o inferiore al 10% delle cellule tumorali	0	Negatività per HER2	Nessuna
colorazione parziale fievole della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	1+	Espressione bassa di HER2	ENHERTU® (trastuzumab deruxitecan)
Colorazione completa da debole a moderata della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	2+* Reflex test: HER2 non amplificato	Espressione bassa di HER2	
	2+* Reflex test: HER2 amplificato	Positività per/sovraespressione di HER2	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansine)
Colorazione completa intensa della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	3+	Positività per/sovraespressione di HER2	

* Si consiglia un reflex test per valutare l'amplificazione del gene, secondo le linee guida ASCO/CAP

Tabella 6. Criteri di intensità e pattern della colorazione di membrana cellulare con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) RxDx nel carcinoma mammario quando si utilizza la procedura di colorazione indicata in Tabella 2.

Pattern di colorazione	Punteggio HER2 (4B5) (segnalare al medico curante)	Utilizzo della procedura di colorazione in Tabella 2: stato di referizzazione consigliato	Applicazione clinica
Colorazione di membrana non osservata oppure colorazione parziale fievole della membrana, in misura pari o inferiore al 10% delle cellule tumorali	0	Negatività per HER2	Nessuna
colorazione parziale fievole della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	1+	Negatività per HER2	
Colorazione completa da debole a moderata della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	2+* Reflex test: HER2 non amplificato	Negatività per HER2	HERCEPTIN (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab), KADCYLA (trastuzumab emtansine)
	2+* Reflex test: HER2 amplificato	Positività per/sovraespressione di HER2	
Colorazione completa intensa della membrana, in misura superiore al 10% delle cellule tumorali	3+	Positività per/sovraespressione di HER2	

* Si consiglia un reflex test per valutare l'amplificazione del gene, secondo le linee guida ASCO/CAP

Convenzioni di assegnazione del punteggio per l'interpretazione dell'anticorpo VENTANA anti-HER2 (4B5) nel carcinoma gastrico

I carcinomi gastrici considerati positivi per la sovraespressione della proteina HER2 devono soddisfare i criteri di soglia relativi all'intensità e al pattern di colorazione di membrana (2+ o superiore su una scala da 0 a 3+) e alla percentuale di cellule tumorali positive. La colorazione deve localizzarsi a livello di membrana cellulare ma non deve necessariamente essere completamente circonferenziale, considerato che normalmente si osserva anche una colorazione basolaterale che deve essere presa in considerazione ai fini del punteggio. Può essere presente colorazione del citoplasma e/o del nucleo ma questa colorazione non è inclusa nella determinazione della positività. Nel carcinoma gastrico la percentuale di cellule tumorali positive varia a seconda che il campione provenga da biopsia (≥ 5 cellule coesive) o resezione (≥ 10%).

Nello stabilire le linee guida per l'assegnazione del punteggio per l'immunostochimica HER2 nel carcinoma gastrico, tenere presente che sebbene un'intensa colorazione di membrana sia evidenza di sovraespressione della proteina HER2 nelle cellule neoplastiche, quest'ultima non deve necessariamente essere completamente circonferenziale.³⁶

Nel carcinoma gastrico, è stata riportata una colorazione citoplasmatica diffusa con o senza colorazione nucleare.³⁷ Ai fini della determinazione dell'espressione della proteina HER2 nel carcinoma gastrico, si deve prendere in considerazione solo la colorazione di membrana.

La colorazione immunostochimica con il clone 4B5 può dare luogo a colorazione citoplasmatica e nucleare della mucosa gastrica normale e, con minore frequenza, delle cellule neoplastiche nel carcinoma gastrico e nel carcinoma della giunzione gastroesofagea. La natura di questa colorazione citoplasmatica e nucleare è attualmente sconosciuta. Questo pattern di colorazione non deve essere confuso con la colorazione di membrana distinta in quanto quest'ultima è indicativa di positività HER2 nelle cellule neoplastiche.

Fare riferimento al documento di guida all'interpretazione VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx Guida all'interpretazione per il carcinoma mammario e gastrico (P/N 1021957IT) per una descrizione più dettagliata accompagnata da fotomicrografie della colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Tabella 7. Criteri di intensità e pattern della colorazione di membrana cellulare con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma gastrico quando si utilizza la procedura di colorazione indicata in Tabella 3.

Pattern di colorazione - campione da resezione	Pattern di colorazione - campione da biopsia	Punteggio (segnalare al medico curante)	Valutazione della colorazione HER2	Applicazione clinica
Nessuna reattività o reattività di membrana in percentuale < 10% delle cellule tumorali	Nessuna reattività o reattività di membrana in qualsiasi cellula tumorale	0	Negatività per HER2	Nessuna
Reattività di membrana fiavole/appena percettibile in percentuale ≥ 10% delle cellule tumorali; le cellule sono reattive solo in parte della rispettiva membrana	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana fiavole/appena percettibile indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	1+	Negatività per HER2	
Reattività di membrana basolaterale o laterale completa, da debole a moderata in percentuale ≥ 10% delle cellule tumorali	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana basolaterale o laterale completa, da debole a moderata indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	2+** Reflex test: HER2 non amplificato	Negatività per HER2	
		2+** Reflex test: HER2 amplificato	Positività per/sovraespressione di HER2	HERCEPTIN (trastuzumab)
Reattività di membrana basolaterale o laterale completa intensa in percentuale ≥ 10% delle cellule tumorali	Cluster di cellule tumorali* con reattività di membrana basolaterale o laterale completa intensa indipendentemente dalla percentuale di cellule tumorali colorate	3+	Positività per/sovraespressione di HER2	

* ≥ 5 cellule coesive

** Si consiglia il reflex test tramite ISH

LIMITAZIONI

Limitazioni generali

1. L'immunoistochimica è un processo diagnostico a più fasi che necessita di formazione specialistica nella scelta dei reagenti appropriati, nella selezione dei tessuti, nella fissazione, processazione, preparazione del vetrino per immunoistochimica e nell'interpretazione dei risultati di colorazione.
2. La colorazione dei tessuti dipende dalla loro manipolazione e processazione prima della colorazione. Condizioni inappropriate di fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, taglio o la contaminazione con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento degli anticorpi o risultati falsi negativi. Variazioni nella fissazione e nei metodi di inclusione o le irregolarità intrinseche del tessuto possono provocare risultati incoerenti.
3. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
4. L'interpretazione clinica di qualunque colorazione positiva o della sua assenza deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione o della sua assenza deve essere integrata da studi morfologici, controlli appropriati e da altri test diagnostici. È responsabilità del patologo qualificato aver acquisito familiarità con gli anticorpi, i reagenti e i metodi utilizzati per interpretare la preparazione colorata. È necessario eseguire la colorazione in un laboratorio certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo responsabile della revisione dei vetrini colorati e che garantisca l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
5. Gli anticorpi e i reagenti VENTANA sono forniti a una diluizione ottimale per l'uso, purché le istruzioni fornite siano rispettate. Qualsiasi deviazione dalle procedure di test consigliate può inficiare i risultati attesi. È indispensabile utilizzare e documentare controlli appropriati. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati dei pazienti.
6. Questo prodotto non è destinato all'uso nella citometria a flusso perché le caratteristiche prestazionali non sono state determinate.
7. I reagenti possono dare luogo a reazioni inattese in tessuti non testati precedentemente. La possibilità di reazioni inattese, anche in gruppi di tessuti già esaminati, non può essere completamente esclusa a causa della variabilità biologica dell'espressione dell'antigene nei neoplasmi e altri tessuti patologici.³⁸

Contattare il rappresentante dell'assistenza locale per segnalare reazioni inattese documentate.

8. I tessuti ottenuti da soggetti affetti dal virus dell'epatite B e contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) possono evidenziare una colorazione aspecifica con la perossidasi di rafano.³⁹
9. I risultati falsi positivi possono essere identificati grazie al legame non immunologico delle proteine o ai prodotti di reazione del substrato. Questi risultati possono anche dipendere dall'attività della pseudoperossidasi (eritrociti), da un'attività di perossidasi endogena (citocromo C) o dalla biotina endogena (ad es. fegato, cervello, mammella, rene) in funzione del tipo di immunocolorezione impiegata.⁴⁰
10. Come in qualsiasi altro test immunoistochimico, un risultato negativo indica che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene è assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti al test.

Limitazioni specifiche

1. Questo anticorpo è stato ottimizzato come indicato in Tabella 1 e Tabella 2 per le chimiche di rilevazione e gli strumenti BenchMark. Una deviazione dai protocolli di colorazione raccomandati in Tabella 1 e Tabella 2 potrebbe produrre campioni di Negative Reagent Control (NRC) non accettabili e campioni colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con un punteggio HER2 alterato. È probabile che un aumento del tempo di incubazione dell'anticorpo produca una colorazione non accettabile nel NRC, con conseguente impossibilità di valutare il campione colorato con l'analisi VENTANA HER2 (4B5). L'aumento o la riduzione dei tempi di smascheramento dell'antigene producono verosimilmente campioni colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con punteggi HER2 alterati, i quali potrebbero portare a decisioni terapeutiche inadeguate per i pazienti. Per ulteriori informazioni sulle variabili di fissazione, fare riferimento a "Immunohistochemistry Principles and Advances".³³
2. L'anticorpo, in combinazione con i kit di rilevazione e gli accessori VENTANA, rileva l'antigene che sopravvive alla fissazione in formalina, alla processazione del tessuto e al taglio normali. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate sono responsabili per l'interpretazione e la convalida dei risultati del paziente.
3. I vetrini devono essere immediatamente colorati, poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate può diminuire con il passare del tempo e può essere compromessa da fattori ambientali durante la conservazione prolungata. I vetrini asciugati all'aria devono essere essiccati e conservati a 2-8 °C. Gli studi hanno dimostrato la stabilità dell'antigene su vetrini non colorati per un minimo di 45 giorni.

- I laboratori devono convalidare la data di scadenza nel proprio ambiente di lavoro se si desidera conservare i vetrini per un periodo superiore a 45 giorni.
- Il midollo osseo non è stato testato per la specificità. L'utilizzatore deve determinare la colorazione adeguata nei tessuti di cui sopra prima dell'interpretazione delle informazioni della colorazione.
 - La colorazione immunostochimica con il clone 4B5 può dare luogo a colorazione citoplasmatica e nucleare della mucosa gastrica normale e, con minore frequenza, delle cellule neoplastiche nel carcinoma gastrico e nel carcinoma della giunzione gastroesofagea. La natura di questa colorazione citoplasmatica e nucleare è attualmente sconosciuta. Questo pattern di colorazione non deve essere confuso con la colorazione di membrana distinta che è indicativa di positività HER2 nelle cellule neoplastiche.
 - Non tutte le analisi potrebbero essere registrate su ogni strumento. Per ulteriori informazioni, contattare il rappresentante locale Roche.
 - Sono state osservate variazioni dello stato di HER2 a fronte di progressione metastatica o dopo il trattamento con chemioterapia neoadiuvante. Sulla base di queste osservazioni, potrebbe essere utile prelevare un campione di nuovo ottenimento per determinare lo stato di HER2 al momento del trattamento, invece di basarsi sullo stato di HER2 passato.⁴¹

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sono stati condotti test di colorazione per la sensibilità, la specificità e la precisione; i relativi risultati sono elencati di seguito.

PRESTAZIONI ANALITICHE

Sensibilità e specificità

La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) è stata determinata tramite uno studio che non ha evidenziato colorazione di membrana specifica per la maggior parte dei tessuti normali. I risultati della colorazione sono elencati in Tabella 8. La sensibilità e la specificità dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) sono state anche determinate tramite uno studio che non ha evidenziato colorazione di membrana specifica nella maggior parte dei tessuti neoplastici. I risultati della colorazione sono elencati in Tabella 9. Le procedure di colorazione per determinare sensibilità e specificità sono state condotte utilizzando il protocollo N/IEW DAB Detection Kit su uno strumento BenchMark XT o il protocollo *ultraView* Universal DAB Detection Kit su uno strumento BenchMark ULTRA.

Una colorazione positiva a livello di epitelio tonsillare, epitelio esofageo, prostata, vescica, nervi periferici, paratiroidi, carcinoma mammario, adenocarcinoma gastrico, colon e carcinoma ovarico è compatibile con quanto riportato nella letteratura pubblicata in merito all'espressione di HER2.

Tabella 8. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) è stata determinata testando tessuti normali FFPE.

Tessuto	N. casi positivi/totali	Tessuto	N. casi positivi/totali
Cervello	0/6	Intestino tenue	0/6
Cervelletto	0/6	Colon	0/46
Ghiandola surrenale	0/6	Fegato	0/6
Ovaio	0/6	Ghiandola salivare	0/3
Pancreas	0/6	Lingua	0/3
Linfonodo	0/12	Rene	0/6
Ghiandola pituitaria	0/5	Prostata	1/6
Testicolo	0/6	Vescica ^b	3/3
Tiroide	0/6	Retto	0/6
Mammella	0/14	Ghiandola paratiroide ^c	4/6
Milza	0/6	Endometrio	0/3
Tonsille ^a	3/6	Utero	0/3
Timo	0/5	Cervice	0/5
Midollo osseo	0/3	Endocervice	0/1

Tessuto	N. casi positivi/totali	Tessuto	N. casi positivi/totali
Polmone	0/6	Muscolo scheletrico	0/6
Cuore	0/5	Cute	0/6
Pericardio	0/3	Nervo	2/6
Esofago	1/6	Mesotelio	0/3
Stomaco	0/11	n/p	n/p

^a Colorazione focale delle cellule epiteliali superficiali

^b Colorazione di membrana delle cellule superficiali a ombrello

^c Colorazione focale della membrana

Tabella 9. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) è stata determinata testando una varietà di tessuti neoplastici FFPE.

Patologia	N. casi positivi/totali
Glioblastoma (cervello)	0/2
Meningioma (cervello)	0/1
Oligodendroglioma (cervello)	0/1
Adenocarcinoma sieroso (ovaio)	0/2
Carcinoma, NAS (non altrimenti specificato) (ovaio)	1/2
Neoplasia neuroendocrina (pancreas)	0/1
Adenocarcinoma (pancreas)	0/1
Carcinoma, NAS (pancreas)	0/3
Seminoma (testicolo)	0/1
Carcinoma embrionale (testicolo)	0/1
Carcinoma midollare (tiroide)	0/1
Carcinoma papillare (tiroide)	0/1
Carcinoma, NAS (tiroide)	0/3
Carcinoma duttale microinvasivo (mammella)	2/2
Carcinoma duttale invasivo (mammella)	44/98
Carcinoma, NAS (mammella)	1/4
Carcinoma a piccole cellule (polmone)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (polmone)	0/1
Carcinoma, NAS (polmone)	0/2
Adenocarcinoma (polmone)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (esofago)	0/1
Adenocarcinoma (esofago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (stomaco)	0/4
Adenocarcinoma (stomaco)	8/88
Carcinoma a cellule ad anello con castone (stomaco)	0/4
Carcinoma, NAS (stomaco)	0/3
Adenocarcinoma (intestino tenue)	0/1
Tumore stromale gastrointestinale (intestino tenue)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/32
Tumore stromale gastrointestinale (colon)	0/1
Carcinoma, NAS (colon)	1/3

Patologia	N. casi positivi/totali
Adenocarcinoma (retto)	1/5
Tumore stromale gastrointestinale (retto)	0/1
Melanoma (retto)	0/1
Carcinoma epatocellulare (fegato)	0/3
Epatoblastoma (fegato)	0/1
Carcinoma, NAS (fegato)	0/3
Carcinoma a cellule chiare (rene)	0/1
Carcinoma, NAS (rene)	0/5
Adenocarcinoma (prostata)	0/2
Carcinoma, NAS (prostata)	0/3
Leiomioma	0/3
Adenocarcinoma (utero)	0/1
Carcinoma a cellule chiare (utero)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (cervice)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionale (muscolatura striata)	0/1
Carcinoma a cellule basali (cute)	0/1
Carcinoma a cellule squamose (cute)	1/1
Neurofibroma (lombare)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma pleomorfo (peritoneo)	0/1
Linfoma, NAS	0/3
Linfoma a cellule B; NAS (milza)	0/1
Linfoma a cellule B; NAS (linfonodo)	0/2
Linfoma di Hodgkin (linfonodo)	0/1
Carcinoma uroteliale (vescica)	1/1
Leiomioma (vescica)	0/1
Osteosarcoma (osso)	0/1
Leiomioma (muscolatura liscia)	0/1
Adenocarcinoma del retto (metastatico)	0/1
Adenocarcinoma del colon (metastatico)	0/7
Adenocarcinoma mucinoso del colon (metastatico)	0/1
Melanoma	0/2
Neoplasia neuroendocrina, NAS	0/2
Sarcoma, NAS	0/2
Carcinoma non differenziato, NAS	0/1

Prestazioni analitiche nel carcinoma mammario con espressione bassa di HER2

Ripetibilità e precisione intermedia per espressione bassa di HER2 su BenchMark ULTRA

Ventiquattro casi di carcinoma mammario compresi nell'intervallo di colorazione IHC per HER2 sono stati inclusi nello studio su ripetibilità e precisione intermedia. Il disegno di studio ha verificato la precisione della colorazione su tessuti di carcinoma mammario colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Tre lotti di VENTANA HER2 (4B5) (tra lotti di anticorpo)
 Tre lotti di *ultraView* DAB IHC Detection Kit (tra lotti di kit di rilevazione)
 Su tre giorni (tra giorni)

Tre strumenti BenchMark ULTRA (tra strumenti)
 Su tutte le condizioni della precisione intermedia (intra-corsa di colorazione)

A ciascun campione è stata assegnata una moda sulla base dei campioni aggregati per condizione di test per le condizioni seguenti: tra lotti di anticorpo, tra lotti di kit di rilevazione, tra strumenti e tra giorni. Per la condizione intra-corsa di colorazione, ciascun campione è stato confrontato all'interno dei rispettivi campioni duplicati per test eseguito. Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati mediante i criteri di intensità e pattern della colorazione di membrana cellulare con la colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) (Tabella 5). I risultati sono riassunti in Tabella 10.

Tabella 10. Ripetibilità e precisione intermedia dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) su tessuti di carcinoma mammario con punteggio HER2 basso

Ripetibilità Precisione	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra lotti di anticorpo	PPA	96/96	100.0	(96.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	144/144	100.0	(97.4, 100.0)
Tra kit di rilevazione	PPA	93/96	96.9	(92.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	141/144	97.9	(94.4, 100.0)
Tra strumenti (BenchMark ULTRA)	PPA	95/96	99.0	(96.7, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	143/144	99.3	(97.9, 100.0)
Tra giorni	PPA	94/96	97.9	(93.3, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	142/144	98.6	(95.8, 100.0)
Intra-corsa di colorazione	PPA	142/144	98.6	(96.5, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	214/216	99.1	(97.7, 100.0)

Nota: concordanza percentuale positiva (PPA), concordanza percentuale negativa (NPA), concordanza percentuale complessiva (OPA).

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) bilaterale al 95% è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili su 2000 campioni bootstrap. Gli intervalli di confidenza per PPA, NPA e OPA al 100% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei a ricevere la terapia per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio clinico, e i punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei a ricevere la terapia mirata per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio.

Studio di confronto di BenchMark ULTRA rispetto a BenchMark XT e BenchMark GX per l'espressione bassa di HER2

Dieci casi di carcinoma mammario compresi nell'intervallo di colorazione IHC per HER2 sono stati inclusi nello studio sulla precisione intermedia. Il disegno di studio ha verificato la precisione della colorazione su tessuti di carcinoma mammario colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) su diversi strumenti e piattaforme.

A ciascun campione è stata assegnata una moda sulla base dei campioni aggregati per condizione di test. Ciascun campione è stato confrontato all'interno dei rispettivi campioni duplicati per test eseguito. Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati mediante i criteri di intensità e pattern della colorazione di membrana cellulare con la colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) (Tabella 5). I risultati sono riassunti in Tabella 11.

Tabella 11. Ripetibilità e precisione intermedia dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) su tessuti di carcinoma mammario con punteggio HER2 basso

Ripetibilità Precisione	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra piattaforme (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Tra strumenti (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Tra strumenti (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Tra strumenti (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: concordanza percentuale positiva (PPA), concordanza percentuale negativa (NPA), concordanza percentuale complessiva (OPA).

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) bilaterale al 95% è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili su 2000 campioni bootstrap. Gli intervalli di confidenza per PPA, NPA e OPA al 100% sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei a ricevere la terapia per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio clinico, e i punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei a ricevere la terapia mirata per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio.

Precisione del patologo per espressione bassa di HER2 su BenchMark ULTRA

La precisione tra patologi e intra-patologo è stata valutata mediante la concordanza dello stato di espressione bassa di HER2 tra tre patologi e in tre singoli patologi. Lo studio includeva 100 casi di carcinoma mammario compresi nell'intervallo di colorazione IHC per HER2. I campioni erano in cieco e randomizzati prima della valutazione dello stato di espressione bassa di HER2 secondo il pattern della colorazione di membrana cellulare ottenuto con la colorazione con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) (Tabella 5). I patologi hanno valutato tutti i campioni due volte, lasciando trascorrere un minimo di due settimane tra le letture. La concordanza della precisione tra patologi e intra-patologo è riepilogata in Tabella 12.

Tabella 12. Precisione tra patologi e intra-patologo dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) con punteggio di espressione bassa di HER2

Precisione	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Intra-patologo	APA	312/333	93.7	(90.9, 96.4)
	ANA	246/267	92.1	(88.0, 95.6)
	OPA	279/300	93.0	(90.0, 96.0)
Tra patologi	APA	300/332	90.4	(85.8, 94.3)
	ANA	236/268	88.1	(82.1, 93.0)
	OPA	268/300	89.3	(84.7, 94.0)

Precisione	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%

Nota: concordanza positiva media (APA), concordanza negativa media (ANA), concordanza percentuale complessiva (OPA).

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) bilaterale al 95% è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili su 2000 campioni bootstrap.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei a ricevere la terapia per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio clinico, e i punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei a ricevere la terapia mirata per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio.

Studio di riproducibilità inter-laboratorio per espressione bassa di HER2 su BenchMark ULTRA

È stato completato uno studio sulla riproducibilità inter-laboratorio dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nel determinare lo stato di espressione bassa di HER2 nei casi di carcinoma mammario. Lo studio ha incluso 28 campioni di tessuto di carcinoma mammario FFPE, de-identificati, di archivio, che sono stati esaminati su tre strumenti BenchMark ULTRA per cinque giorni non consecutivi nel corso di 20 giorni, presso tre laboratori esterni. I campioni erano rappresentativi dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Ciascun set di 5 vetrini colorati per campione per giorno di colorazione è stato randomizzato e valutato da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) relativamente allo stato di espressione bassa di HER2. I risultati dello stato di espressione bassa di HER2 per tutti i patologi, i centri e i giorni per i casi sono stati combinati e analizzati rispetto alle mode dei patologi per gli stessi casi per determinare la riproducibilità complessiva dello stato di espressione bassa di HER2. I tassi di concordanza tra tutte le osservazioni valutabili, utilizzando come riferimento le mode dei patologi a livello di campione per lo stato di espressione bassa di HER2, sono riepilogati in Tabella 13.

Tabella 13. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza complessiva per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con punteggio HER2 basso

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Complessiva	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
Intra-centro	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
Intra-patologo	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)

Nota: concordanza percentuale positiva (PPA), concordanza percentuale negativa (NPA), concordanza percentuale complessiva (OPA).

Nota: gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei a ricevere la terapia per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio clinico, e i punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei a ricevere la terapia mirata per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio.

Sono stati inoltre effettuati confronti a coppie tra centri, tra patologi e tra giorni per lo stato di espressione bassa di HER2. Un riepilogo dei risultati è disponibile in Tabella 14. I dati indicano la riproducibilità dell'analisi tra 5 giorni, 3 centri e 6 patologi.

Tabella 14. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza a coppie per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) con punteggio HER2 basso

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra centri	APA	7884/8102	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	8240/8458	97.4	(95.7, 98.8)
	OPA	8062/8280	97.4	(95.5, 98.8)
Tra patologi	APA	398/409	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	414/425	97.4	(95.6, 98.8)
	OPA	406/417	97.4	(95.5, 98.8)
Tra giorni	APA	1580/1620	97.5	(95.9, 98.9)
	ANA	1652/1692	97.6	(96.2, 98.9)
	OPA	1616/1656	97.6	(96.1, 98.9)

Nota: concordanza positiva media (APA), concordanza negativa media (ANA), concordanza percentuale complessiva (OPA).

Nota: gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei a ricevere la terapia per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio clinico, e i punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei a ricevere la terapia mirata per espressione bassa di HER2, come stabilito nel disegno dello studio.

Prestazioni analitiche in casi di tessuto mammario con espressione bassa di HER2

Concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS per l'espressione bassa di HER2

Tre laboratori hanno partecipato a uno studio di concordanza volto a valutare l'equivalenza di prestazione tra lo strumento BenchMark ULTRA e lo strumento BenchMark ULTRA PLUS. Per l'analisi statistica relativa all'espressione bassa di HER2, 160 casi (80 positivi e 80 negativi, tra cui 16 casi borderline) sono stati pre-selezionati per l'analisi prima che il patologo procedesse alla loro valutazione. Vetrini di tessuto ottenuti da tutti i casi sono stati colorati con un controllo negativo del reagente e con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) presso un laboratorio interno di Roche su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando il protocollo di colorazione consigliato. Vetrini di tessuto non colorati ottenuti da tutti i casi sono stati randomizzati e distribuiti in pari misura per la colorazione su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS utilizzando il protocollo di colorazione consigliato per VENTANA HER2 (4B5). Un patologo per centro, in cieco rispetto allo stato dei casi, ha valutato i vetrini colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS e ha determinato lo stato HER2 (4B5). I risultati sono stati analizzati da Roche. I risultati sono riassunti in Tabella 15.

Tabella 15. Concordanza riunita dello stato di espressione bassa di HER2 per casi colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5): confronto tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Totale
	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Negativo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Negativo	
Positivo	272	13	25	11	321
Negativo	8	9	2	298	317
Totale	280	22	27	309	638

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Totale
	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Negativo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Negativo	
Percentuale positivi % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	n/p
	n/N		% (CI al 95%)		
PPA	285/302		94.4 (91.6, 96.8)		
NPA	300/336		89.3 (84.3, 94.4)		
OPA	585/638		91.7 (88.5, 94.6)		

Nota: PPA = concordanza percentuale positiva; NPA = concordanza percentuale negativa; OPA = concordanza percentuale complessiva.

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione IHC.

Nota: la concordanza riunita includeva tutti i casi e i patologi ULTRA PLUS.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei per lo studio clinico volto a indagare il carcinoma mammario con espressione bassa di HER2. I punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei per lo studio clinico.

Studio di riproducibilità inter-laboratorio - BenchMark ULTRA PLUS per l'espressione bassa di HER2

È stato completato uno studio sulla riproducibilità inter-laboratorio dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nel determinare lo stato di espressione bassa di HER2 nei casi di carcinoma mammario.

Lo studio ha incluso 28 campioni di tessuto di carcinoma mammario FFPE, de-identificati, di archivio, che sono stati esaminati su tre strumenti BenchMark ULTRA PLUS per cinque giorni non consecutivi nel corso di 20 giorni, presso tre laboratori esterni. I campioni erano rappresentativi dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Ciascun set di 5 vetrini colorati per campione per giorno di colorazione è stato randomizzato e valutato da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) relativamente allo stato di espressione bassa di HER2. I risultati dello stato di espressione bassa di HER2 per tutti i patologi, i centri e i giorni per i casi sono stati combinati e analizzati rispetto alle mode dei patologi per gli stessi casi per determinare la riproducibilità complessiva dello stato di espressione bassa di HER2. I tassi di concordanza tra tutte le osservazioni valutabili, utilizzando come riferimento le mode dei patologi a livello di campione per lo stato di espressione bassa di HER2, sono riepilogati in Tabella 16.

Tabella 16. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza complessiva per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma mammario con punteggio di espressione bassa di HER2.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Analisi primaria/Complessiva	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Stratificata per centro	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Stratificata per patologo	PPA	412/425	96.9	(94.8, 98.7)

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
	NPA	405/415	97.6	(94.9, 100.0)
	OPA	817/840	97.3	(95.2, 98.9)

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione.

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei per lo studio clinico volto a indagare il carcinoma mammario con espressione bassa di HER2. I punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei per lo studio clinico.

Sono stati inoltre effettuati confronti a coppie tra centri, tra patologi e tra giorni per lo stato HER2 (4B5). Come riassunto in Tabella 17, l'analisi è risultata riproducibile tra 5 giorni, 3 centri e 6 patologi.

Tabella 17. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza a coppie per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma mammario con punteggio di espressione bassa di HER2.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra centri	APA	7982/8440	94.6	(90.3, 97.9)
	ANA	7902/8360	94.5	(90.6, 98.0)
	OPA	7942/8400	94.5	(90.5, 98.0)
Tra patologi	APA	402/422	95.3	(91.7, 98.1)
	ANA	398/418	95.2	(91.8, 98.1)
	OPA	400/420	95.2	(91.9, 98.1)
Tra giorni	APA	1608/1688	95.3	(91.5, 98.2)
	ANA	1592/1672	95.2	(91.8, 98.2)
	OPA	1600/1680	95.2	(91.8, 98.2)

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 pari a 0 e a 3+ sono stati raggruppati come casi negativi in quanto non idonei per lo studio clinico volto a indagare il carcinoma mammario con espressione bassa di HER2. I punteggi HER2 pari a 1+ e a 2+ sono stati raggruppati come casi positivi in quanto idonei o potenzialmente idonei per lo studio clinico.

Prestazioni analitiche in casi di tessuto mammario con positività per HER2

Concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS per la positività per HER2

Tre laboratori hanno partecipato a uno studio di concordanza volto a valutare l'equivalenza di prestazione tra lo strumento BenchMark ULTRA e lo strumento BenchMark ULTRA PLUS. Per l'analisi della positività per HER2, un punteggio HER2 IHC pari a 2+ o a 3+ è definito HER2 positivo e un punteggio pari a 0 o a 1+ è definito HER2 negativo. Per l'analisi statistica relativa alla positività per HER2, 160 casi (80 positivi e 80 negativi, tra cui 16 casi borderline) sono stati pre-selezionati per l'analisi prima che il patologo procedesse alla loro valutazione. Vetrini di tessuto ottenuti da tutti i casi sono stati colorati con un controllo negativo del reagente e con l'analisi VENTANA HER2 (4B5) presso un laboratorio interno di Roche su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando il protocollo di colorazione consigliato. Vetrini di tessuto non colorati ottenuti da tutti i casi sono stati randomizzati e distribuiti in pari misura per la colorazione su uno strumento

BenchMark ULTRA PLUS utilizzando il protocollo di colorazione consigliato per VENTANA HER2 (4B5). Un patologo per centro, in cieco rispetto allo stato dei casi, ha valutato i vetrini colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS e ha determinato lo stato HER2 (4B5). I risultati sono stati analizzati da Roche. I risultati sono riassunti in Tabella 18.

Tabella 18. Concordanza riunita dello stato di positività per HER2 per casi colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5): confronto tra strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Totale
	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Positivo, Patologo esterno = Negativo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Positivo	Patologo Roche = Negativo, Patologo esterno = Negativo	
Positivo	245	18	11	13	287
Negativo	6	13	5	327	351
Totale	251	31	16	340	638
Percentuale positivi % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	n/p
	n/N		% (CI al 95%)		
PPA	(263/282)		93.3 (89.3, 96.6)		
NPA	(332/356)		93.3 (89.7, 96.5)		
OPA	(595/638)		93.3 (90.8, 95.6)		

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione IHC (0, 1+, 2+, 3+).

Nota: la concordanza riunita includeva tutti i casi e i patologi ULTRA PLUS.

Nota: PPA = concordanza percentuale positiva; NPA = concordanza percentuale negativa; OPA = concordanza percentuale complessiva.

Studio di riproducibilità inter-laboratorio - BenchMark ULTRA PLUS per la positività per HER2

È stato completato uno studio sulla riproducibilità inter-laboratorio dell'analisi VENTANA HER2 (4B5) per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nel determinare lo stato di positività per HER2 nei casi di carcinoma mammario. Lo studio ha incluso 28 campioni di tessuto di carcinoma mammario FFPE, de-identificati, di archivio, che sono stati esaminati su tre strumenti BenchMark ULTRA PLUS per cinque giorni non consecutivi nel corso di 20 giorni, presso tre laboratori esterni. I campioni erano rappresentativi dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 (4B5).

Ciascun set di 5 vetrini colorati per campione per giorno di colorazione è stato randomizzato e valutato da un totale di 6 patologi (2 patologi/centro) relativamente allo stato di positività per HER2. I risultati dello stato di positività per HER2 per tutti i patologi, i centri e i giorni per i campioni sono stati combinati e analizzati rispetto alle mode dei patologi per gli stessi campioni per determinare la riproducibilità complessiva dello stato di positività per HER2. I tassi di concordanza tra tutte le osservazioni valutabili, utilizzando come riferimento le mode dei patologi a livello di campione per lo stato di positività per HER2, sono riepilogati in Tabella 19.

Tabella 19. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza complessiva per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma mammario con punteggio di positività per HER2.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	bilaterale
Analisi primaria/Complessiva	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	bilaterale
Stratificata per centro	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Stratificata per patologo	PPA	413/420	98.3	(96.9, 99.5)
	NPA	412/420	98.1	(95.8, 100.0)
	OPA	825/840	98.2	(96.9, 99.4)

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 IHC pari a 0 e a 1+ sono stati raggruppati come negativi e i punteggi HER2 IHC pari a 2+ e a 3+ sono stati raggruppati come positivi.

Sono stati inoltre effettuati confronti a coppie tra centri, tra patologici e tra giorni per lo stato HER2 (4B5). Come riassunto in Tabella 20, l'analisi è risultata riproducibile tra 5 giorni, 3 centri e 6 patologici.

Tabella 20. Riproducibilità inter-laboratorio per i tassi di concordanza a coppie per l'analisi VENTANA HER2 (4B5) nel carcinoma mammario con colorazione positiva per HER2.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra centri	APA	8074/8420	95.9	(92.8, 98.6)
	ANA	8034/8380	95.9	(92.5, 98.7)
	OPA	8054/8400	95.9	(92.7, 98.6)
Tra patologici	APA	402/421	95.5	(92.0, 98.6)
	ANA	400/419	95.5	(91.6, 98.6)
	OPA	401/420	95.5	(91.9, 98.6)
Tra giorni	APA	1634/1684	97.0	(95.0, 98.9)
	ANA	1626/1676	97.0	(94.8, 98.9)
	OPA	1630/1680	97.0	(95.0, 98.9)

Nota: l'intervallo di confidenza (CI) al 95% bilaterale è stato calcolato con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati stratificati in base ai gruppi di punteggio di qualificazione

Nota: ai fini dell'analisi dello studio, i punteggi HER2 IHC pari a 0 e a 1+ sono stati raggruppati come negativi e i punteggi HER2 IHC pari a 2+ e a 3+ sono stati raggruppati come positivi.

Caratteristiche prestazionali su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando iVIEW DAB Detection Kit o *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Colorazione inter-laboratorio e riproducibilità tra giorni su uno strumento BenchMark ULTRA: Hanno partecipato allo studio di riproducibilità inter-laboratorio tre laboratori di istituzioni distinte degli Stati Uniti. Sezioni montate su vetrino ottenute da 48 casi di carcinoma mammario invasivo FFPE [12 da ciascuna categoria di punteggio di HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] e 1 coppia di PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides per ciascuna delle 12 corse di colorazione sono state distribuite ai centri di studio per la colorazione su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando il protocollo di colorazione consigliato e *ultraView* Universal DAB Detection Kit. I controlli includevano PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides e un secondo vetrino di ciascun caso colorato con reagente Ig negativo. Patologi in cieco rispetto allo stato dei casi hanno valutato i vetrini e assegnato un punteggio clinico (ossia 0, 1+, 2+, 3+). I risultati sono stati analizzati da Ventana.

Utilizzando la nomenclatura standard per le tabelle 2x2, la concordanza positiva media (APA) tra i centri è stata calcolata come $[2a/(2a+b+c)]$ e la concordanza negativa media (ANA) come $[2d/(2d+b+c)]$. Tra tutti i centri, l'APA tra centri basata sulla valutazione clinica (positiva, negativa) è risultata pari a 90.0% (108/120) e l'ANA a 92.9% (156/168). Per i confronti a coppie tra centri, l'APA è stata calcolata come $a/(a+c)$ e l'ANA come $d/(b+d)$. I tassi APA inter-centri sono risultati pari rispettivamente a 93.0% (40/43), 87.2% (34/39) e 89.5% (34/38) per il Centro A rispetto al Centro B, per il Centro A rispetto al Centro C e per il Centro B rispetto al Centro C. I tassi ANA inter-centri sono risultati pari rispettivamente a 94.3% (50/53), 91.2% (52/57) e 93.1% (54/58) per il Centro A rispetto al Centro B, per il Centro A rispetto al Centro C e per il Centro B rispetto al Centro C.

Nelle tabelle che seguono sono presentati in formato 3x3 i risultati per ciascun patologo in base al punteggio clinico in cui i punteggi 2+ e 3+ erano separati.

Tabella 21. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza inter-laboratorio per il centro A rispetto al centro B - clone 4B5, strumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Centro A	Centro B			Totale
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Totale	12	9	27	48
Concordanza percentuale complessiva (OPA): n/N				43/48 (89.6) (77.8-95.5)
(%)(CI al 95%)				

Tabella 22. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza inter-laboratorio per il centro A rispetto al centro C - clone 4B5, strumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Centro A	Centro C			Totale
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Totale	12	5	31	48
Concordanza percentuale complessiva (OPA): n/N				42/48 (87.5) (75.3-94.1)
(%)(CI al 95%)				

Tabella 23. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza inter-laboratorio per il centro B rispetto al centro C - clone 4B5, strumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Centro B	Centro C			Totale
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Totale	12	5	31	48
Concordanza percentuale complessiva (OPA): n/N				44/48 (91.7) (80.4-96.7)
(%)(CI al 95%)				

Riproducibilità della colorazione tra giorni sullo strumento BenchMark ULTRA
La sezione dello studio relativa alla riproducibilità tra giorni (IDR) ha incluso 12 casi con una distribuzione intesa di circa tre (3) casi per ciascun punteggio clinico (0, 1+, 2+, 3+). In totale, le cinque corse di colorazione sullo strumento BenchMark ULTRA presso il singolo istituto (Centro C) che ha condotto la sezione IDR dello studio hanno avuto luogo nell'arco di almeno 20 giorni, in modo che non vi fossero due giorni di colorazione consecutivi. I

tassi APA e ANA per l'IDR basati sulla valutazione clinica della colorazione con il clone 4B5 presso il centro C nel corso di tutti i giorni erano entrambi pari al 100%. I tassi di concordanza percentuale complessiva (OPA) per i confronti tra giorni in base ai punteggi clinici sono risultati pari a 100% per ciascuno dei confronti tra giorno e giorno e per tutti i giorni combinati.

Studio di confronto tra lo strumento BenchMark ULTRA e lo strumento BenchMark XT

Allo studio di confronto tra piattaforme hanno partecipato due singoli laboratori di colorazione e tre centri di lettura negli Stati Uniti. Sezioni montate su vetrino ottenute da 280 casi di carcinoma mammario invasivo FFPE [circa 70 casi da ciascuna categoria di punteggio di HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] sono state distribuite in maniera randomizzata tra due laboratori di colorazione (140 casi a ciascun centro) per la colorazione su uno strumento BenchMark XT e su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando i rispettivi protocolli di colorazione consigliati e *ultraView* Universal DAB Detection Kit. I controlli includevano PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides e un secondo vetrino di ciascun caso colorato con reagente Ig negativo. I casi colorati dal Centro 1 e dal Centro 2 sono stati divisi in quattro set di vetrini e messi a disposizione, un set alla volta, di tre diversi patologi qualificati, uno presso il Centro 1, uno presso il Centro 2 e uno presso il Centro 3. I patologi, in cieco rispetto allo stato dei casi e alla piattaforma di colorazione, hanno valutato tutti i quattro set di vetrini e assegnato un punteggio clinico (ossia 0, 1+, 2+, 3+) a ciascun caso. I risultati sono stati analizzati da Ventana. I tassi PPA (e l'estremo inferiore degli intervalli di confidenza bilaterali al 95%) per la colorazione con l'anticorpo clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono risultati pari a 91.6% (85.9), 91.2% (85.3) e 94.9% (89.3) rispettivamente per il patologo A, B e C. I tassi NPA (e l'estremo inferiore degli intervalli di confidenza bilaterali al 95%) per la colorazione con l'anticorpo clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono risultati pari a 91.9 (85.8), 93.8% (88.3) e 99.3 (96.3) rispettivamente per il patologo A, B e C. I tassi OPA per la colorazione con il clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT in base a un'analisi 2x2 della valutazione clinica (positiva, negativa) sono risultati pari a 91.8%, 92.5% e 97.4% rispettivamente per il patologo A, B e C. I tassi di concordanza tra piattaforme in formato 3x3 per ciascun patologo in base al punteggio clinico (0/1+, 2+, 3+) sono mostrati nelle tabelle che seguono.

Tabella 24. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT - patologo A.

Strumento BenchMark ULTRA	Strumento BenchMark XT			
Patologo A	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Totale	96	47	124	267
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) 226/267 (84.6) (79.8-88.5) (CI al 95%)				

Tabella 25. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT - patologo B.

Strumento BenchMark ULTRA	Strumento BenchMark XT			
Patologo B	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Totale	69	68	130	267
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) 242/267 (90.6) (86.5-93.6) (CI al 95%)				

Tabella 26. Analisi 3x3 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark ULTRA rispetto allo strumento BenchMark XT - patologo C.

Strumento BenchMark ULTRA	Strumento BenchMark XT			
Patologo C	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Totale	66	52	149	267
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) 257/267 (96.3) (93.2-98.0) (CI al 95%)				

Riproducibilità tra patologi dei campioni dello studio di confronto degli strumenti
Sono stati calcolati i tassi di concordanza positiva e negativa con intervalli di confidenza bilaterali al 95% del punteggio per i sei possibili confronti a coppie tra patologi per ciascuna piattaforma.

Per lo strumento BenchMark ULTRA, i tassi PPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati pari rispettivamente a 94.7% (126/133), 98.2% (111/113), 98.2% (111/113), 89.4% (126/141), 78.7% (111/141) e 83.5% (111/133). I tassi NPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati rispettivamente pari a 88.8% (119/134), 80.5% (124/154), 85.7% (132/154), 94.4% (119/126), 98.4% (124/126) e 98.5% (132/134). Il tasso OPA più elevato è stato registrato tra il patologo A e il patologo B (91.8%) mentre tassi più bassi sono stati registrati tra il patologo B e il patologo C (91.0%) e tra il patologo A e il patologo C (88.8%).

Per lo strumento BenchMark XT, i tassi PPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati pari rispettivamente a 94.9% (130/137), 98.3% (116/118), 98.3% (116/118), 90.9% (130/143), 81.1% (116/143) e 84.7% (116/137). I tassi NPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati rispettivamente pari a 90.0% (117/130), 81.9% (122/149), 85.9% (128/149), 94.4% (117/124), 98.4% (122/124) e 98.5% (128/130). Il tasso OPA più elevato è stato registrato tra il patologo A e il patologo B (92.5%) mentre tassi più bassi sono stati registrati tra il patologo B e il patologo C (91.4%) e tra il patologo A e il patologo C (89.1%).

Studio di confronto tra iVIEW DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit

La coorte del centro 1 costituita da 140 casi di carcinoma mammario invasivo FFPE [circa 35 da ciascuna categoria di punteggio di HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] è stata utilizzata in uno studio di confronto tra *MIEW* DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit nella colorazione con il clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA. Allo studio di confronto della rilevazione hanno partecipato un singolo laboratorio di colorazione e tre centri di lettura negli Stati Uniti. Per la colorazione con l'anticorpo clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA i tassi PPA tra i risultati ottenuti utilizzando i metodi *MIEW* DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono risultati pari a 95.8% (68/71), 96.9% (63/65) e 96.5% (55/57) rispettivamente per i patologi A, B e C e i tassi NPA tra i metodi di rilevazione sono risultati pari a 90.8% (59/65), 91.5% (65/71) e 97.5% (77/79) rispettivamente per i patologi A, B e C. I tassi OPA tra kit di rilevazione sono risultati pari a 93.4% (127/136), 94.1% (128/136) e 97.1% (132/136) rispettivamente per i patologi A, B e C. I tassi di concordanza del confronto tra rilevazioni in formato 3x3 per ciascun patologo in base al punteggio clinico (0/1+, 2+, 3+) sono mostrati nelle tabelle che seguono.

Tabella 27. Patologo A, analisi 3x3 dei tassi di concordanza *MIEW* DAB Detection Kit rispetto a *ultraView* Universal DAB Detection Kit - colorazione con il clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA.

<i>MIEW</i> DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Patologo A	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62

MIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Patologo A	3+	2+	0, 1+	Totale
Totale	46	25	65	136
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) (CI al 95%) 119/136 (87.5) (80.9-92.0)				

Tabella 28. Patologo B, analisi 3x3 dei tassi di concordanza MIEW DAB Detection Kit rispetto a ultraView Universal DAB Detection Kit - colorazione con il clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA.

MIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Patologo B	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Totale	33	32	71	136
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) (CI al 95%) 128/136 (94.1) (88.8-97.0)				

Tabella 29. Patologo C, analisi 3x3 dei tassi di concordanza MIEW DAB Detection Kit rispetto a ultraView Universal DAB Detection Kit - colorazione con il clone 4B5 sullo strumento BenchMark ULTRA.

MIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Patologo C	3+	2+	0, 1+	Totale
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Totale	32	25	79	136
Concordanza percentuale complessiva: n/N (%) (CI al 95%) 132/136 (97.1) (92.7-98.9)				

Riproducibilità tra patologi dei campioni dello studio di confronto della rilevazione: Sono stati calcolati i tassi di concordanza positiva e negativa con intervalli di confidenza bilaterali al 95% del punteggio per i sei possibili confronti a coppie tra patologi per ciascun metodo.

Per MIEW DAB Detection Kit, i tassi PPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati pari rispettivamente a 100.0% (69/69), 98.2% (56/57), 96.5% (55/57), 93.2% (69/74), 75.7% (56/74) e 79.7% (55/69). I tassi NPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati rispettivamente pari a 92.5% (62/67), 77.2% (61/79), 82.3% (65/79), 100.0% (62/62), 98.4% (61/62) e 97.0% (65/67). Il tasso di concordanza complessiva più elevato è stato registrato tra il patologo A e il patologo B (96.3%) mentre tassi più bassi sono stati registrati tra il patologo A e il patologo C (86.0%) e il patologo B e il patologo C (88.2%).

Per ultraView Universal DAB Detection Kit, i tassi PPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati pari rispettivamente a 96.9% (63/65), 98.2% (56/57), 98.2% (56/57), 88.7% (63/71), 78.9% (56/71) e 86.2% (56/65). I tassi NPA per il patologo A rispetto a B, A rispetto a C, B rispetto a C, B rispetto ad A, C rispetto ad A e C rispetto a B sono risultati rispettivamente pari a 88.7% (63/71), 81.0% (64/79), 88.6% (70/79), 96.9% (63/65), 98.5% (64/65) e 98.6% (70/71). I tassi di concordanza complessiva sono risultati simili per ciascuna coppia di patologi, 92.6% (126/136), 88.2% (120/136) e 92.6% (126/136) rispettivamente per il patologo A rispetto a B, per il patologo A rispetto a C e per il patologo B rispetto a C.

Prestazioni analitiche in casi di tessuto gastrico

Studi sulla precisione degli strumenti BenchMark ULTRA e BenchMark XT:

La ripetibilità tra corse di colorazione sullo strumento BenchMark XT è stata determinata in cinque corse di colorazione condotte in un periodo di 5 giorni (non consecutivi). Cinque vetrini contenenti tre casi di tessuto gastrico con punteggi di espressione di HER2 pari a 0, 1+, 2+ e 3+ hanno evidenziato una concordanza del 100% entro il valore positivo/negativo per ciascun tessuto.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione sullo strumento BenchMark XT è stata determinata su 28 vetrini contenenti tre casi di tessuto gastrico con punteggi di espressione di HER2 pari a 0, 1+, 2+ e 3+. Tutti i casi hanno ottenuto un punteggio equivalente entro il valore positivo/negativo per ciascun tipo di tessuto.

La ripetibilità all'interno della piattaforma è stata determinata su tre strumenti BenchMark XT. In queste corse di colorazione, tutti i 30 vetrini da ciascuno di due diversi blocchi multi-tessuto contenenti tre casi di tessuto gastrico con punteggi di espressione di HER2 pari a 0, 1+, 2+ e 3+ hanno ottenuto un punteggio equivalente entro il valore positivo/negativo per ciascun tipo di tessuto.

La ripetibilità della piattaforma è stata testata su tre strumenti BenchMark ULTRA. In queste corse di colorazione, tutti i 15 vetrini da un blocco multi-tessuto hanno ottenuto un punteggio equivalente entro il valore positivo/negativo per ciascun tipo di tessuto.

La ripetibilità tra piattaforme è stata testata su tre strumenti BenchMark XT e su tre strumenti BenchMark ULTRA. In queste corse di colorazione, tutti i 30 vetrini da un blocco multi-tessuto hanno ottenuto un punteggio equivalente entro il valore positivo/negativo per ciascun tipo di tessuto.

Confronto tra MIEW DAB Detection Kit e ultraView Universal DAB Detection Kit con casi gastrici

Il clone 4B5 è stato utilizzato per condurre test di confronto tra kit di rilevazione tra due strumenti (strumento BenchMark XT e strumento BenchMark ULTRA) utilizzando MIEW DAB Detection Kit e ultraView Universal DAB Detection Kit. Come parte del test, sono stati utilizzati duecentodieci casi di tessuto. I vetrini colorati sono stati valutati per il punteggio clinico positivo/negativo.

I tassi di accettabilità morfologica e del fondo sono stati del 100% per entrambi i kit di rilevazione e gli strumenti. I confronti diretti per la valutazione clinica positiva e negativa tra i kit di rilevazione per ciascuno strumento sono presentati nelle seguenti tabelle.

Tabella 30. Valutazione clinica per ultraView Universal DAB Detection Kit rispetto a MIEW DAB Detection Kit sullo strumento BenchMark XT.

ultraView Universal DAB Detection Kit	MIEW DAB Detection Kit		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	21	0	21
Negativo	0	189	189
Totale	21	189	210
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale positiva	21/21	100 (84.5-100)	
Concordanza percentuale negativa	189/189	100 (98.0-100)	
Concordanza percentuale complessiva	210/210	100 (98.2-100)	

Tabella 31. Confronto della valutazione clinica su strumenti BenchMark XT e BenchMark ULTRA utilizzando ultraView Universal DAB Detection Kit.

Strumento BenchMark XT con ultraView Universal DAB Detection Kit	Strumento BenchMark ULTRA con ultraView Universal DAB Detection Kit		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	20	1	21
Negativo	0	189	189
Totale	20	190	210

Strumento BenchMark XT con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	Strumento BenchMark ULTRA con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positivo	Negativo	Totale
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale positiva	20/20	100 (83.9-100)	
Concordanza percentuale negativa	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Concordanza percentuale complessiva	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

Riproducibilità inter-laboratorio del clone 4B5 nel carcinoma gastrico:

Lo studio è stato condotto presso tre centri. I campioni sono stati selezionati per l'inclusione nello studio in base al punteggio clinico IHC ottenuto con il clone 4B5 in modo che vi fosse un numero circa pari di casi positivi (3+) e negativi (0, 1+). Sono stati inoltre inclusi nello studio fino a quattro casi di cancro gastrico qualificato 2+.

Ciascuno dei tre centri ha utilizzato uno strumento BenchMark XT e uno strumento BenchMark ULTRA per effettuare quattro corse di colorazione per strumento. I casi sono stati randomizzati per la colorazione utilizzando una procedura di randomizzazione stratificata che assegnava i casi in modo che ciascuna corsa di colorazione contenesse casi a rappresentazione di tutte le categorie di punteggio per HER2 nel carcinoma gastrico. Le corse su ciascuno strumento presso ciascun centro contenevano gli stessi casi. Presso ciascun centro, un vetrino da ciascun caso è stato colorato con il clone 4B5 e un altro vetrino dallo stesso caso è stato colorato con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig sullo strumento BenchMark ULTRA. Una seconda coppia di vetrini dello stesso caso è stata colorata in modo analogo sullo strumento BenchMark XT presso ciascun centro. Il punteggio dei vetrini dei casi è stato assegnato presso ciascun centro da un patologo qualificato in cieco rispetto ai punteggi clinici IHC determinati in precedenza per ciascun campione.

La concordanza complessiva per tutti i casi valutabili è risultata pari a 100% per tutti i tre confronti tra centro e centro sia sullo strumento BenchMark ULTRA che sullo strumento BenchMark XT. La concordanza complessiva tra lo strumento BenchMark ULTRA e lo strumento BenchMark XT per i casi valutabili è risultata pari a 100% presso ciascuno dei tre centri. I tassi di accettabilità morfologica e del fondo per tutti i casi sono risultati pari a 100% per entrambi gli strumenti presso i centri A e C e > 95% per entrambi gli strumenti presso il centro B (vedere le tabelle che seguono).

Tabella 32. Concordanza complessiva delle valutazioni cliniche tra centri: carcinoma gastrico, tutti i casi valutabili.

Strumento BenchMark ULTRA	Concordanza percentuale complessiva (casi positivi e negativi)	Concordanza percentuale complessiva (casi equivoci inclusi)
Centro A rispetto a Centro B: n/N (%) (CI al 95%)	30/30 (100%) (88.6-100)	38/42 (90.5%) (77.9-96.2)
Centro A rispetto a Centro C: n/N (%) (CI al 95%)	30/30 (100%) (88.6-100)	35/42 (83.3%) (69.4-91.7)
Centro B rispetto a Centro C: n/N (%) (CI al 95%)	30/30 (100%) (88.6-100)	31/42 (73.8%) (58.9-84.7)
Strumento BenchMark XT	Concordanza percentuale complessiva (casi positivi e negativi)	Concordanza percentuale complessiva (casi equivoci inclusi)
Centro A rispetto a Centro B: n/N (%) (CI al 95%)	31/31 (100%) (89.0-100.0)	36/43 (83.7%) (70.0-91.9)
Centro A rispetto a Centro C: n/N (%) (CI al 95%)	31/31 (100%) (89.0-100.0)	36/43 (83.7%) (70.0-91.9)
Centro B rispetto a Centro C: n/N (%) (CI al 95%)	31/31 (100%) (89.0-100.0)	35/43 (81.4%) (67.4-90.3)

Tabella 33. Concordanza complessiva delle valutazioni cliniche tra piattaforme: carcinoma gastrico, tutti i casi valutabili.

Strumento BenchMark ULTRA rispetto a strumento BenchMark XT	Concordanza percentuale complessiva (casi positivi e negativi)	Concordanza percentuale complessiva (casi equivoci inclusi)
Centro A: n/N (%) (CI al 95%)	40/40 (100%) (91.2-100)	42/44 (95.5%) (84.9-98.7)
Centro B: n/N (%) (CI al 95%)	34/34 (100%) (89.8-100)	37/42 (88.1%) (75.0-94.8)
Centro C: n/N (%) (CI al 95%)	32/32 (100%) (89.3-100)	38/44 (86.4%) (73.3-93.6)

Tabella 34. Tassi di accettabilità morfologica e della colorazione di fondo: carcinoma gastrico, tutti i casi.

Strumento BenchMark ULTRA	Centro A	Centro B	Centro C
Tassi di accettabilità morfologica	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Tassi di accettabilità del fondo	44/44 (100%)	42/44 (95.5%)	44/44 (100%)
Strumento BenchMark XT	Centro A	Centro B	Centro C
Tassi di accettabilità morfologica	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)
Tassi di accettabilità del fondo	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	44/44 (100%)

Studio di confronto tra lo strumento BenchMark e lo strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT: Carcinoma gastrico

Sezioni montate su vetrino ottenute da 3 microarray di tessuto (TMA) contenenti casi di carcinoma gastrico FFPE [circa 50 casi per TMA] sono state colorate su uno strumento BenchMark XT, su uno strumento BenchMark e su uno strumento BenchMark GX utilizzando i rispettivi protocolli di colorazione consigliati per *ultraView* Universal DAB Detection Kit e iVIEW DAB Detection Kit. I controlli includevano PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides e un secondo vetrino di ciascun TMA colorato con reagente Ig negativo. Un unico operatore (patologo) ha assegnato il punteggio ai vetrini colorati.

I tassi di concordanza complessiva (e l'estremo inferiore degli intervalli di confidenza bilaterali al 95%) per la colorazione con l'anticorpo clone 4B5 in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono i seguenti: strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.0% (94.2-99.3), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97.4% (93.6-99.0), strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con iVIEW DAB Detection Kit 96.6% (92.7-98.4), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con iVIEW DAB Detection Kit 95.9% (91.8-98.0).

I tassi di concordanza positiva (e l'estremo inferiore degli intervalli di confidenza bilaterali al 95%) per la colorazione con l'anticorpo clone 4B5 in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono i seguenti: strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91.7% (64.4-98.5), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78.6% (52.4-92.4), strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con iVIEW DAB Detection Kit 80.0% (54.8-93.0), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con iVIEW DAB Detection Kit 73.3% (48.0-89.1).

I tassi di concordanza negativa (e l'estremo inferiore degli intervalli di confidenza bilaterali al 95%) per la colorazione con clone 4B5 in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono i seguenti: strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5% (94.8-99.6), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3% (96.1-99.9), strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con iVIEW DAB

Detection Kit 98.1% (94.6-99.4), strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *VIEW DAB* Detection Kit 98.1% (94.5-99.3). I tassi di concordanza per ciascun confronto in formato 2x2 in base alla valutazione clinica (positiva, negativa) sono mostrati nelle tabelle che seguono.

Tabella 35. Analisi 2x2 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit: carcinoma gastrico.

Clone 4B5 con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Strumento BenchMark	Strumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	11	2	13
Negativo	1	133	134
Totale	12	135	147
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale complessiva	144/147 98.0% (94.2-99.3)		
Concordanza percentuale positiva	11/12 91.7% (64.6-98.5)		
Concordanza percentuale negativa	133/135 98.5% (94.8-99.6)		

Tabella 36. Analisi 2x2 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit: carcinoma gastrico.

Clone 4B5 con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Strumento BenchMark GX	Strumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	11	1	12
Negativo	3	140	143
Totale	14	141	155
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale complessiva	151/155 97.4% (93.6-99.0)		
Concordanza percentuale positiva	11/14 78.6% (52.4-92.4)		
Concordanza percentuale negativa	140/141 99.3% (96.1-99.9)		

Tabella 37. Analisi 2x2 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark rispetto allo strumento BenchMark XT con *iVIEW DAB* Detection Kit: carcinoma gastrico.

Clone 4B5 con <i>iVIEW DAB</i> Detection Kit			
Strumento BenchMark	Strumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	12	3	15
Negativo	3	156	159
Totale	15	159	174
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale complessiva	168/174 96.6% (92.7-98.4)		
Concordanza percentuale positiva	12/15 80.0% (54.8-93.0)		
Concordanza percentuale negativa	156/159 98.1% (94.6-99.4)		

Tabella 38. Analisi 2x2 dei tassi di concordanza tra piattaforme dello strumento BenchMark GX rispetto allo strumento BenchMark XT con *iVIEW DAB* Detection Kit: carcinoma gastrico.

Clone 4B5 con <i>iVIEW DAB</i> Detection Kit			
Strumento BenchMark GX	Strumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	11	3	14
Negativo	4	154	158
Totale	15	157	172
	n/N	% (CI al 95%)	
Concordanza percentuale complessiva	165/172 95.9% (91.8-98.0)		
Concordanza percentuale positiva	11/15 73.3% (48.0-89.1)		
Concordanza percentuale negativa	154/157 98.1% (94.5-99.3)		

PRESTAZIONI CLINICHE

Carcinoma mammario con espressione bassa di HER2

Studio sull'esito clinico - DESTINY-BREAST04

DESTINY-BREAST04 è stato uno studio open-label di fase III randomizzato multicentrico con controllo attivo, mirato a valutare la sicurezza e l'efficacia di trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) in soggetti con carcinoma mammario non resecabile e/o metastatico che esprimono livelli bassi di HER2.

Per essere idonei all'inclusione nello studio, i tumori dovevano dimostrare bassi livelli di espressione di HER2 determinati tramite IHC con l'anticorpo anti-HER2 (4B5).

Un tumore con punteggio HER2 IHC pari a 1+ era considerato con stato di espressione bassa di HER2. I tumori erano inoltre considerati con stato di espressione bassa di HER2 se il punteggio HER2 IHC era pari a 2+ e il reflex test con l'analisi INFORM HER2 Dual ISH indicava l'assenza di amplificazione del gene HER2 (ISH-). I pazienti arruolati sono stati randomizzati in rapporto 2:1 al trattamento con trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) o con chemioterapia scelta dal medico. Il punteggio HER2 basso ottenuto a livello centrale (IHC 1+ o IHC 2+/ISH-) era uno dei 3 fattori di stratificazione utilizzati per la randomizzazione dei pazienti nello studio.

Sono state condotte analisi di efficacia nel set di analisi completo e nella popolazione positiva per il recettore ormonale (positiva per il recettore degli estrogeni e/o il recettore del progesterone).

Nell'analisi primaria è stata analizzata la sopravvivenza libera da progressione (PFS) valutata tramite revisione centrale indipendente in cieco (BIRC) nel sottogruppo positivo per il recettore ormonale con stratificazione per stato di espressione bassa di HER2/punteggio basso (IHC 1+ o IHC 2+/ISH-), numero di linee di chemioterapia precedenti (1 o 2) e precedente trattamento con inibitore delle CDK (chinasi ciclina dipendenti) 4/6 (sì o no). Il trattamento con trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) era associato a un aumento statisticamente e clinicamente significativo della PFS, nonché della sopravvivenza globale (OS) in questa popolazione rispetto a quella trattata con la terapia scelta dal medico.

Tabella 39. PFS e OS secondo BIRC nella popolazione positiva per il recettore ormonale e set di analisi completo (DESTINY-BREAST04)

Parametro	Popolazione positiva per il recettore ormonale		Set di analisi completo	
	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Trattamento scelto dal medico N = 163	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Trattamento scelto dal medico N = 184
PFS mediana a (CI al 95%)	10.1 (9.5, 11.5)	5.4 (4.4, 7.1)	9.9 (9.0, 11.3)	5.1 (4.2, 6.8)
Rapporto di rischio b (CI al 95%)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	

Parametro	Popolazione positiva per il recettore ormonale		Set di analisi completo	
	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Trattamento scelto dal medico N = 163	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Trattamento scelto dal medico N = 184
Valore p c	< 0.0001		< 0.0001	
Sopravvivenza globale (OS)				
OS mediana a (CI al 95%)	23.9 (20.8, 24.8)	17.5 (15.2, 22.4)	23.4 (20.0, 24.8)	16.8 (14.5, 20.0)
Rapporto di rischio b (CI al 95%)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
Valore p c	0.0028		0.0010	

CI = intervallo di confidenza; PFS = sopravvivenza libera da progressione; OS = sopravvivenza globale

^a PFS mediana e OS sono stime tratte dall'analisi di Kaplan-Meier. Gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% per PFS mediana e OS sono stati calcolati con il metodo di Brookmeyer-Crowley.

^b Basato sul modello di rischio proporzionale di Cox stratificato. I fattori di stratificazione erano i seguenti: punteggio HER2 basso, numero di linee di chemioterapia precedenti e precedente trattamento con inibitore delle chinasi ciclina dipendenti 4/6 (per il set di analisi completo e la popolazione positiva per il recettore ormonale) o stato di recettore ormonale/chinasi ciclina dipendenti (per il set di analisi completo).

^c Valore p bilaterale ottenuto dal log-rank test stratificato.

Carcinoma mammario HER2 positivo

Studi di confronto tra l'anticorpo monoclonale di coniglio clone 4B5 e PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody nel carcinoma mammario

È stato condotto uno studio di confronto fra metodi per esaminare la correlazione tra il clone 4B5 e PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)) e PathVysion HER2 FISH, entrambi test diagnostici precedentemente approvati. Allo studio hanno partecipato sei sperimentatori. Nello studio sono state utilizzate due coorti indipendenti di campioni di carcinoma mammario invasivo: una coorte con 178 campioni provenienti dalla Cleveland Clinic Foundation (coorte 1) e una coorte con 144 campioni raccolti da IMPATH Predictive Oncology da diversi centri internazionali (coorte 2). Due gruppi di tre diversi sperimentatori hanno valutato due coorti indipendenti (coorte 1: n = 178, coorte 2: n = 144) utilizzando casi noti di carcinoma mammario colorati con l'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) e con il clone 4B5. I dati FISH sono stati ottenuti dall'anamnesi dei pazienti. Per ridurre la variabilità intra-patologo, che come noto esiste nell'assegnazione dei punteggi HER2, è stato creato per ciascun caso un punteggio di consenso dai tre patologi per ciascun anticorpo.^{42,43,44} È stato valutato un totale di 322 casi. I vetrini colorati con l'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) sono stati processati e colorati secondo le istruzioni del produttore indicate nella scheda metodologica dell'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11). In media è trascorso circa un anno tra la colorazione e la lettura dei vetrini colorati con l'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11). I risultati clinicamente significativi (positivi/negativi) dell'analisi IHC con HER2 (4B5) e dell'analisi IHC con PATHWAY anti-HER2 (CB11) nelle due coorti sono riportati di seguito:

Tabella 40. Punteggi clinicamente significativi: Analisi IHC per la coorte 1

Anticorpo HER2 (4B5)	Anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	86	5	91
Negativo	7	80	87
Totale	93	85	178
	n/N	% (Intervallo di confidenza al 95%)	

Anticorpo HER2 (4B5)	Anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Positivo	Negativo	Totale
Concordanza percentuale positiva	86/93	92.5 (85.2-96.9)	
Concordanza percentuale negativa	80/85	94.1 (86.8-98.1)	
Concordanza percentuale complessiva	166/178	93.3 (88.5-96.4)	
I risultati clinicamente significativi sono stati considerati IHC positivi (2+ e 3+) e negativi (0+ e 1+).			

Tabella 41. Punteggi clinicamente significativi: Analisi IHC per la coorte 2

Anticorpo HER2 (4B5)	Anticorpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	69	22	91
Negativo	0	53	53
Totale	69	75	144
	n/N	% (Intervallo di confidenza al 95%)	
Concordanza percentuale positiva	69/69	100 (97.5-100)	
Concordanza percentuale negativa	53/75	70.6 (58.5-80.1)	
Concordanza percentuale complessiva	122/144	84.7 (78.2-90.0)	
I risultati clinicamente significativi sono stati considerati IHC positivi (2+ e 3+) e negativi (0+ e 1+).			

I risultati ottenuti dall'analisi IHC con l'anticorpo HER2 (4B5) sono inoltre stati messi a confronto con i risultati dell'analisi PathVysion HER2 FISH. I risultati IHC positivi corrispondono ai casi con un punteggio IHC pari a 2+ o 3+ e i risultati FISH positivi corrispondono ai casi che hanno dimostrato un'amplificazione del gene HER2. I dati di concordanza per l'analisi IHC con il clone 4B5 a confronto con i risultati FISH nelle due coorti sono riportati di seguito:

Tabella 42. Concordanza clinicamente significativa: Confronto tra IHC e FISH per la coorte 1

Anticorpo HER2 (4B5)	n/N	% (Intervallo di confidenza al 95%)
Concordanza percentuale positiva	83/93	89.2 (82.5-95.1)
Concordanza percentuale negativa	77/85	90.6 (84.0-96.4)
Concordanza percentuale complessiva	160/178	90.0 (85.4-93.6)

Tabella 43. Concordanza clinicamente significativa: Confronto tra IHC e FISH per la coorte 2

Anticorpo HER2 (4B5)	n/N	% (Intervallo di confidenza al 95%)
Concordanza percentuale positiva	80/86	93.0 (87.9-96.3)
Concordanza percentuale negativa	47/58	81.0 (73.4-86.0)
Concordanza percentuale complessiva	127/144	88.2 (82.1-92.2)

Conclusione: questo studio ha dimostrato l'esistenza di una concordanza significativa (concordanza complessiva tra risultati positivi/negativi) tra l'analisi con il clone 4B5 e

L'analisi PATHWAY anti-HER2 (CB11), dimostrando pertanto che l'analisi VENTANA HER2 (4B5) è un'alternativa accettabile all'analisi PATHWAY anti-HER2 (CB11) per l'uso come ausilio alla valutazione di pazienti con carcinoma mammario per i quali viene presa in considerazione la terapia a base di trastuzumab (Herceptin). Questo studio ha inoltre dimostrato che i risultati relativi all'espressione di HER2 ottenuti con l'analisi IHC con il clone 4B5 sono simili ai risultati relativi allo stato del gene *HER2* determinati tramite FISH. Confronto rispetto all'analisi di arruolamento degli studi PERJETA (pertuzumab) e KADCYLA (trastuzumab emtansine) nel carcinoma mammario

La concordanza rispetto alle analisi di arruolamento per le coorti degli studi PERJETA e KADCYLA è stata determinata colorando campioni degli studi con l'analisi VENTANA HER2 (4B5). In totale, 2753 campioni valutati per lo studio PERJETA e 99 campioni valutati per lo studio KADCYLA sono stati colorati con l'analisi VENTANA HER2 (4B5). Sono stati determinati i tassi di concordanza (PPA, NPA e OPA). L'intervallo di confidenza al 95% (CI bilaterale al 95%) è stato calcolato con il metodo del punteggio.

Tabella 44. Concordanza tra il clone 4B5 e le analisi Dako relativamente allo stato HER2 per tutti i soggetti valutabili HER2. I soggetti valutabili tramite IHC presentano uno stato HER2 positivo o negativo determinato sia tramite il clone 4B5 sia tramite l'analisi IHC di arruolamento.

Studio	Punteggio con il clone 4B5 ^b	Stato Dako HER2 ^{a,b}		
		Positivo	Negativo	Totale
PERJETA e KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Totale	2558	272	2830
	Concordanza percentuale positiva n/N (%) (CI al 95%)	2380/2558 (93.0) (92.0-94.0)		
	Concordanza percentuale negativa n/N (%) (CI al 95%)	257/272 (94.5) (91.1-96.6)		
	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	2637/2830 (93.2) (92.2-94.1)		

^a Positivo = IHC positivo e/o amplificato con ISH. Negativo = IHC negativo e non amplificato con ISH oppure non amplificato con ISH e non IHC positivo.

^b IHC: positivo = 3+; negativo = 0, 1+ o 2+.

Tabella 45. Concordanza tra il clone 4B5 e le analisi Dako relativamente allo stato IHC per tutti i soggetti valutabili tramite IHC. I soggetti valutabili tramite IHC presentano uno stato HER2 positivo o negativo determinato sia tramite il clone 4B5 sia tramite l'analisi IHC di arruolamento.

Studio	Stato con il clone 4B5 ^a	Stato Dako HercepTest ^a		
		Positivo	Negativo	Totale
PERJETA e KADCYLA	Positivo	2330	65	2395
	Negativo	21	414	435
	Totale	2351	479	2830
	Concordanza percentuale positiva n/N (%) (CI al 95%)	2330/2351 (99.1) (98.6-99.4)		
	Concordanza percentuale negativa n/N (%) (CI al 95%)	414/479 (86.4) (83.1-89.2)		
PERJETA	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	2744/2830 (97.0) (96.3-97.5)		
	Positivo	2267	63	2330
	Negativo	10	399	409
	Totale	2277	462	2739
	Concordanza percentuale positiva n/N (%) (CI al 95%)	2267/2277 (99.6) (99.2-99.8)		
	Concordanza percentuale negativa n/N (%) (CI al 95%)	399/462 (86.4) (82.9-89.2)		
KADCYLA	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	2666/2739 (97.3) (96.7-97.9)		
	Positivo	63	2	65
	Negativo	11	15	26
	Totale	74	17	91
	Concordanza percentuale positiva n/N (%) (CI al 95%)	63/74 (85.1) (75.3-91.5)		
	Concordanza percentuale negativa n/N (%) (CI al 95%)	15/17 (88.2) (65.7-96.7)		
Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	78/91 (85.7) (77.1-91.5)			

^a Positivo = 3+; negativo = 0, 1+ o 2+.

Tabella 46. Concordanza tra il clone 4B5 e le analisi Dako relativamente al punteggio IHC per tutti i soggetti valutabili tramite IHC. I soggetti valutabili tramite IHC presentano uno stato HER2 positivo o negativo determinato sia tramite il clone 4B5 sia tramite l'analisi IHC di arruolamento.

Studio	Punteggio con il clone 4B5	Punteggio con Dako HercepTest			
		3+	2+	0/1+	Totale
PERJETA e KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Totale	2351	325	154	2830
	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	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
	Totale	2277	312	150	2739
	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	2629/2739 (96.0) (95.2-96.7)			
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Totale	74	13	4	91
	Concordanza percentuale complessiva n/N (%) (CI al 95%)	74/91 (81.3) (72.1-88.0)			

Tabella 47. Accettabilità della colorazione con il clone 4B5. Soggetti testati tramite IHC. La colorazione IHC è considerata accettabile se è stato possibile determinare un punteggio IHC valido (0, 1+, 2+ o 3+). Le ragioni alla base di una colorazione inaccettabile includono controllo negativo inaccettabile, perdita di tessuto, tumore insufficiente, fondo inaccettabile e morfologia inaccettabile.

Parametro	PERJETA	KADCYLA	PERJETA e KADCYLA
Numero di test IHC iniziali	2753	99	2852
n/N (%) dell'accettabilità della colorazione iniziale (CI al 95%)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Numero di test IHC ripetuti	40	0	40

Parametro	PERJETA	KADCYLA	PERJETA e KADCYLA
n/N (%) dell'accettabilità della colorazione finale (CI al 95%)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

Studio sull'esito clinico - KATHERINE

Le prestazioni del clone di HER2 4B5 e di INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (analisi INFORM HER2 Dual ISH) sono state esaminate nello studio open-label di fase III randomizzato multicentrico KATHERINE (BO27938) mirato a valutare l'efficacia e la sicurezza di trastuzumab emtansine (KADCYLA) rispetto a trastuzumab (Herceptin) come terapia adiuvante per i pazienti con carcinoma mammario primario HER2 positivo con presenza patologica di tumore residuo nella mammella o nei linfonodi ascellari a seguito della terapia pre-operatoria (NCT01772472).

I campioni dei pazienti sono stati colorati con il clone 4B5 e/o con INFORM HER2 Dual ISH e valutati per l'accettabilità della colorazione e lo stato HER2. Nel complesso, la maggior parte dei campioni era rappresentata da biopsie pre-trattamento (80.9%), raccolte prevalentemente con tecnica biottica (75.3%) o con metodi chirurgici (24.3%). Più campioni presentavano il sottotipo neoplastico duttale (95.4%) e la maggior parte non erano stati ottenuti da un campione metastatico (96.2%).

Nello studio KATHERINE sono stati arruolati 1486 pazienti con carcinoma mammario precoce HER2 positivo e tumore invasivo residuale nella mammella e/o nei linfonodi ascellari a seguito della terapia a base di taxano e trastuzumab come parte di un regime neoadiuvante prima dell'arruolamento nello studio. I pazienti sono stati sottoposti a radioterapia e/o terapia ormonale in concomitanza al trattamento dello studio, in base alle linee guida locali. I campioni di carcinoma mammario dovevano presentare sovraespressione di HER2 definita come IHC 3+ o rapporto di amplificazione ISH ≥ 2.0 in base alla determinazione presso un laboratorio centrale. I pazienti sono stati randomizzati (1:1) per ricevere trastuzumab o KADCYLA. La randomizzazione è stata stratificata in base allo stadio clinico alla presentazione, allo stato del recettore ormonale, alla terapia pre-operatoria diretta contro l'HER2 (trastuzumab, trastuzumab e uno o più ulteriori agenti diretti contro l'HER2) e allo stato nodale patologico valutato dopo la terapia pre-operatoria. L'endpoint primario di efficacia dello studio KATHERINE era la sopravvivenza libera da malattia invasiva (IDFS). L'IDFS era definita come l'arco di tempo dalla data della randomizzazione alla prima occorrenza di ricorrenza di carcinoma mammario invasivo ipsilaterale, ricorrenza di carcinoma mammario invasivo locale o regionale ipsilaterale, ricorrenza distante, carcinoma mammario invasivo controlaterale o decesso da qualsiasi causa.

È stato osservato un miglioramento clinicamente e statisticamente significativo dell'IDFS nei pazienti i cui campioni di carcinoma mammario erano stati identificati come HER2 positivi tramite analisi IHC con il clone 4B5, che ricevevano trastuzumab emtansine (KADCYLA) rispetto a trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, CI al 95% [0.32, 0.58]), corrispondente a una riduzione del 57% nel rischio di un evento IDFS. I risultati in termini di efficacia per il sottogruppo IHC positivo sono presentati in Tabella 48.

L'analisi dei dati mostra anche che, con o senza l'aggiustamento per il campionamento differenziale nella popolazione oggetto dello studio dovuto al pre-screening di test locale, le stime di efficacia dei farmaci sono simili.

Tabella 48. Risultati in termini di efficacia dello studio KATHERINE per il sottogruppo IHC positivo.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
Endpoint primario	Sopravvivenza libera da malattia invasiva (IDFS) ^a	
Numero (%) di pazienti con l'evento	64 (11.2%)	130 (23.3%)
HR [CI al 95%]	0.43 [0.32, 0.58]	
Tasso di libertà da eventi a 3 anni % ^b	89.0	75.7

^a Dati dalla prima analisi ad interim

^b Tasso di libertà da eventi a 3 anni derivato dalle stime di Kaplan-Meier

I dati dello studio KATHERINE mostrano che l'adiuvante trastuzumab emtansine (KADCYLA) ha offerto un chiaro beneficio terapeutico rispetto all'adiuvante trastuzumab (Herceptin) in pazienti affetti da carcinoma mammario precoce HER2 positivo e malattia residua dopo il completamento del trattamento neoadiuvante. L'analisi con il clone di HER2 4B5 e l'analisi INFORM HER2 Dual ISH sono utili nell'identificazione dei pazienti che presentano una probabilità di trarre beneficio dal trattamento con trastuzumab emtansine (KADCYLA).

Carcinoma gastrico

Confronto tra il clone 4B5 ed HercepTest nel carcinoma gastrico umano

È stato condotto uno studio esterno in cieco per confrontare le prestazioni di colorazione del clone 4B5 sullo strumento BenchMark XT con quelle di Dako HercepTest. Sono state studiate due coorti di campioni: (1) microarray di tessuto (TMA) di nuova realizzazione contenenti 248 casi di carcinoma gastrico (successivamente è stato riscontrato che sei casi erano duplicati; tali casi sono stati rimossi) e (2) un sottoinsieme di 183 campioni dello studio clinico Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) che ha esaminato lo stato HER2 e l'esito clinico in pazienti trattati con Herceptin (trastuzumab). Il laboratorio ha colorato i casi con il clone 4B5 e con HercepTest. Un totale di 431 casi è stato colorato con entrambe le analisi e (dopo aver rimosso i casi duplicati) sono stati inclusi 398 casi unici nel confronto. Un patologo ha assegnato il punteggio ai casi su una scala 0/1+, 2+ e 3+. Ai casi positivi sono assegnati i punteggi 2+ o 3+, mentre ai casi negativi i punteggi 0 o 1+. I tassi di concordanza tra il clone 4B5 ed HercepTest per entrambe le coorti oggetto dello studio sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 49. Dati di concordanza per il clone 4B5 (IHC) rispetto a HercepTest nel carcinoma gastrico.

Origine del tessuto	Concordanza percentuale complessiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale positiva (CI al 95%)	Concordanza percentuale negativa (CI al 95%)
TMA ^a e ToGA ^b	91.0 (87.7-93.4)	82.1 (70.2-90.0)	92.4 (89.1-94.8)
n	362/398	46/56	316/342

I risultati IHC sono stati considerati positivi (2+ e 3+) e negativi (0+ e 1+) all'anticorpo.

^a TMA: campioni microarray di tessuto

^b ToGA: campioni di studio clinico dallo studio ToGA

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

- Se il controllo positivo mostra una colorazione più debole rispetto alle previsioni, verificare gli altri controlli positivi analizzati contemporaneamente sullo strumento per determinare se la causa è l'anticorpo primario o uno dei reagenti secondari in comune.
- Se il controllo positivo è negativo, assicurarsi che il vetrino abbia l'etichetta con codice a barre corretta. Se l'etichetta del vetrino è corretta, verificare gli altri controlli positivi analizzati contemporaneamente sullo strumento per determinare se la causa è l'anticorpo primario o uno dei reagenti secondari in comune. I tessuti potrebbero essere stati raccolti, fissati o sparaffinati non correttamente. Seguire la procedura corretta per la raccolta, la conservazione e la fissazione.
- Se non è stata rimossa tutta la paraffina, la colorazione potrebbe essere assente. La procedura di sparaffinatura deve essere ripetuta.
- In caso di dilavamento delle sezioni di tessuto dal vetrino, controllare i vetrini per assicurarsi che siano caricati positivamente.
- Se è presente colorazione nucleare e citoplasmatica nella mucosa normale in stretta prossimità dell'area tumorale nel carcinoma gastrico e tale colorazione complica l'interpretazione della colorazione di membrana, il caso può essere testato tramite ISH.
- Per l'azione correttiva, fare riferimento alla sezione Procedura di colorazione, alla guida per l'utente dello strumento oppure contattare il rappresentante dell'assistenza locale.

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232: 1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO*. 1987; 6: 605-610.

- Schrohl AS, Pedersen HC, Jensen SS, Nielsen SL, Brüner N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) immunoreactivity: specificity of three pharmacodiagnostic antibodies. *Histopathology*. 2011;59(5):975-983.
- Jay JI, Brunhoeber PS, Smith MH, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). *Histopathology*. 2013;62(4):563-577.
- Moasser MM. The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of HER2, EGFR, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
- Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, et al. HER2-low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J Clin Oncol*. 2020;38:1951-1962.
- Osborne CK, Shou J, Massarweh S, et al. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res* 11:865s-870s, 2005.
- Eiger D, Agostinetto E, Saude-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2021;13.
- Zhang H, Katerji H, Turner BM, Hicks DG. HER2-low Breast Cancers. *Am J Clin Pathol*. 2021.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697.
- Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2019;90(1):44-54.
- Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
- Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):476-484.
- The Global Cancer Observatory: Cancer Today (GLOBOCAN) 2020. International Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:1364-1382.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
- Hudis CA. Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.
- Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
- von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-628.
- 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.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.

26. Modi S, Park H, Murthy RK, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J Clin Oncol.* 2020;38:1887-1896.
27. Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer [published online ahead of print, 2022 Jun 5]. *N Engl J Med.* 2022;10.1056/NEJMoa2203690.
28. Cislo M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, et al. Distinct Molecular Subtypes of Gastric Cancer: From Lauren to Molecular Pathology. *Oncotarget.* 2018;9(27):19427-19442.
29. Carson FL, Cappellano C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
30. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
31. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
32. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
33. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
34. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
35. CLSI. *Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline.* CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
36. Hoffmann M, et al. *Histopathology.* 2008;52:797-805.
37. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch.* 2010;457(3):299-307.
38. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
39. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1980;73(5):626-32.
40. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.
41. Ahn S, Woo JW, Lee K, et al. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *J Pathol Trans Med.* 2020;54:34-44.
42. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent *in situ* hybridization. *Mod Pathol.* 2001;14:1079-86.
43. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol.* 1994;47:816-22.
44. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol.* 2003;16:173-182.

NOTA: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

Un riepilogo dei dati su sicurezza e prestazioni è disponibile qui:

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

Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1 (per gli Stati Uniti: visitare il sito elabdoc.roche.com/symbols per maggiori informazioni).



Numero Prodotto Globale

Rx only

Per gli Stati Uniti: Attenzione: Le leggi federali consentono la vendita di questo dispositivo solo da parte di un medico o solo su prescrizione medica.

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev	Aggiornamenti
C	Aggiornamenti alla sezione Procedura di colorazione e alle convenzioni di punteggio per il carcinoma gastrico nella Tabella 7. Correzioni alla terminologia e alla punteggiatura. Aggiunta degli strumenti BenchMark ULTRA PLUS.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY e ULTRAVIEW sono marchi commerciali di Roche. Tutti gli altri nomi di prodotto e marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

INFORMAZIONI DI CONTATTO



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

www.roche.com

