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

REF 790-4493

05999570001

IVD Σ 50

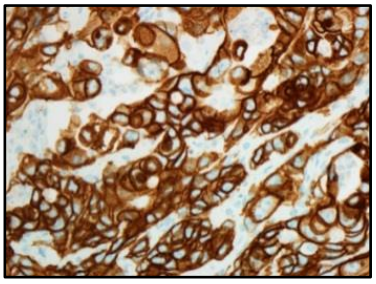

Figure 1. Coloration d'intensité 3+ du tissu d'un carcinome gastrique à l'aide de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5).

UTILISATION PREVUE

Le VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody est destiné à être utilisé en laboratoire pour la détection semi-quantitative de l'antigène HER2 dans des coupes de tissus de carcinomes gastriques et mammaires néoplasiques et normaux fixés au formol et inclus en paraffine colorées sur un appareil BenchMark IHC/ISH.

Il est indiqué en tant qu'aide à l'évaluation des patients atteints d'un cancer du sein ou de l'estomac pour lesquels est envisagé un traitement par Herceptin® (trastuzumab) et des patientes atteintes d'un cancer du sein pour lesquelles est envisagé un traitement par KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansine) ou PERJETA® (pertuzumab).

Ce produit doit être interprété par un anatomopathologiste qualifié, en complément d'examens histologiques, d'informations cliniques pertinentes et de contrôles adaptés.

Cet anticorps est conçu pour une utilisation en diagnostic in vitro (IVD).

RESUME ET EXPLICATION

Le VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5)) est un anticorps monoclonal de lapin (clone 4B5) dirigé contre le domaine interne du récepteur 2 de l'EGF (epidermal growth factor) humain (HER2). Le gène HER2 a été cloné et caractérisé par Akiyama *et al*. en 1986.[1] Il a été montré par western blot de lysats de cellules SK-BR-3 que le clone 4B5 réagit avec une protéine de 185 kD. SK-BR-3 est une lignée de cellules de carcinome du sein présentant une surexpression d'un facteur 128 de l'ARNm d'HER2.[2] La taille de la bande identifiée correspond bien à celle rapportée pour la protéine HER2 (185 kD).[1] Des expériences d'immunohistochimie (IHC) sur des lignées cellulaires transfectées (HEK293) ont montré que le clone 4B5 permet de colorer les cellules transfectées avec HER2 et les cellules transfectées avec HER4. Aucune coloration des cellules transfectées avec HER1 ou HER3 n'a été observée. De plus, les données de western blot obtenues avec une protéine HER4 recombinante indiquent que le clone 4B5 reconnaît un épitope d'HER4.

HER2 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase d'environ 185 kD dont la structure est similaire à celle du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor).[3,4] L'amplification du gène HER2 et la surexpression de la protéine correspondante qui l'accompagne ont été observées dans diverses tumeurs, dont les carcinomes mammaires et gastriques.[3,4,5] La surexpression de la protéine due à l'amplification du gène *HER2* est la principale cause de la tumorigenèse médiée par HER2.[3] L'augmentation de la transduction du signal induite par l'excès d'expression de la protéine HER2 au niveau de la membrane cellulaire conduit à l'amplification de la prolifération et de la différenciation et, finalement, à la formation d'une tumeur.[3,4,5]

Entre 15 et 30 % des cancers canalaires invasifs du sein sont positifs pour la surexpression de la protéine et/ou l'amplification du gène HER2.[6,7] Pratiquement tous les cas de maladie de Paget du sein et jusqu'à 90 % des cas de carcinome canalaire in situ de type comédocarcinome sont positifs.[6,8] L'amplification du gène et/ou la surexpression de la protéine HER2 est également observée dans les adénocarcinomes gastriques et de la jonction gastro-œsophagienne.[9,10,11] La fréquence de la surexpression d'HER2 constatée dans les différentes études publiées est très variable. Cependant, dans l'un des plus grands ensembles de données de dépistage qui comprenait 3803 patients atteints d'adénocarcinome gastrique ou de la jonction gastro-œsophagienne, 22 % des patients étaient positifs pour la surexpression de la protéine ou l'amplification du gène.[12]

SIGNIFICATION CLINIQUE

Le cancer du sein est le carcinome le plus fréquent chez les femmes et la deuxième cause majeure de mortalité liée au cancer.[4,6] En Amérique du Nord, une femme sur huit risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie.[4] Un dépistage précoce et des traitements appropriés peuvent avoir une incidence notable sur la survie globale.[13,14] L'immunohistochimie (IHC) de routine pouvant facilement être pratiquée sur des petits échantillons de tissu, cette technique, lorsqu'elle est utilisée avec des anticorps qui détectent des antigènes importants pour l'interprétation du carcinome, constitue pour l'anatomopathologiste un outil efficace pour la formulation du diagnostic et du pronostic de la maladie. De nos jours, l'oncoprotéine HER2 est l'un des marqueurs importants du cancer du sein.[15-18] Des études ont montré que les agents thérapeutiques Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) et KADCYLA (ado-trastuzumab emtansine/trastuzumab emtansine) sont bénéfiques pour certaines patientes atteintes d'un carcinome du sein en stoppant et, dans certains cas, en inversant la croissance de leur cancer.[15-19] Ces médicaments sont des anticorps monoclonaux humanisés qui se lient à la protéine HER2 sur les cellules cancéreuses.[7,15,18,19] Les tests diagnostiques in vitro d'évaluation du statut HER2 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein sont importants pour aider le clinicien à décider d'un traitement ciblant HER2.[15-18] La détection par IHC de l'expression de la protéine HER2 est utilisée comme aide à l'évaluation des patientes atteintes d'un cancer du sein pour lesquelles les traitements ciblant HER2 Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) ou KADCYLA (trastuzumab emtansine) sont envisagés.

Le cancer de l'estomac est le cinquième cancer le plus fréquent et l'une des principales causes de décès liés au cancer dans le monde.[10] La chirurgie est le traitement le plus fréquent du cancer de l'estomac.[11,20] La plupart des cas de cancer de l'estomac sont cependant détectés à un stade avancé et sont souvent difficiles à opérer.[11,20] La chimiothérapie est utilisée pour traiter le cancer de l'estomac avancé bien que le taux de survie des patients atteints de ce cancer soit très faible. [11,20] Le trastuzumab, un traitement ciblant HER2, est un pilier de la prise en charge du carcinome invasif du sein et a une valeur thérapeutique établie dans la prise en charge des patients atteints de cancer de l'estomac surexprimant le récepteur.[9,11] La démonstration de l'amplification du gène et/ou de la surexpression de la protéine *HER2* est une étape essentielle de la sélection des patients pour lesquels un traitement par trastuzumab est indiqué.[9,11] Des études cliniques ont montré que les patients atteints de cancer du sein ou de cancer de l'estomac avec des niveaux élevés de surexpression de la protéine et/ou d'amplification du gène HER2 sont ceux qui bénéficient le plus d'un traitement par trastuzumab.[9] La détection par IHC de l'expression de la protéine HER2 est utilisée comme aide à l'évaluation des patients atteints d'un cancer de l'estomac pour lesquels un traitement par Herceptin (trastuzumab) est envisage.

L'interprétation des résultats de tout système de détection d'HER2 doit s'effectuer en tenant compte du fait qu'HER2 est exprimée tant dans les tumeurs cancéreuses que dans le tissu normal du sein et de l'estomac, mais à des niveaux et avec des profils d'expression différents.[10,21] Les préparations histologiques présentent l'avantage de conserver intacte la morphologie des tissus, ce qui simplifie l'interprétation de la positivité pour HER2 de l'échantillon.

PRINCIPE DE LA PROCEDURE

L'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) est un anticorps monoclonal de lapin qui se lie à la protéine HER2 dans les coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). L'anticorps spécifique peut être localisé avec une préparation d'anticorps secondaires conjugués à la biotine reconnaissant les immunoglobulines de lapin et un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort (HRP) (*i*VIEW DAB Detection Kit) ou un anticorps secondaires conjugués à l'HRP (*ultra*View Universal DAB Detection Kit). Le complexe anticorps-enzyme spécifique est ensuite visualisé par précipitation du produit de la réaction enzymatique. Chaque étape d'incubation est réalisée à une température spécifique pendant une durée déterminée. À la fin de chaque étape d'incubation, l'appareil lave les coupes pour arrêter la réaction et éliminer les substances non liées qui peuvent gêner la réaction souhaitée dans les étapes suivantes. L'appareil applique une solution de Liquid Coverslip (LCS) qui minimise l'évaporation des réactifs aqueux des lames portant les échantillons.

Les cas cliniques doivent être évalués à la lumière des performances des contrôles appropriés. Il est recommandé d'inclure un tissu de contrôle positif fixé et préparé de la même manière que l'échantillon du patient (par exemple un tissu de carcinome du sein ou

de l'estomac faiblement positif). En plus de la coloration avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5), une seconde lame doit être colorée avec le CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Pour que le test soit considéré comme valide, le tissu de contrôle positif doit présenter une coloration membranaire des cellules tumorales. Ces composants doivent être négatifs lorsque la procédure de coloration est réalisée avec le CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. De plus, il est recommandé d'inclure un tissu de contrôle négatif (par exemple un tissu de carcinome du sein ou de l'estomac HER2 négatif) à chaque lot d'échantillons traités et colorés sur l'appareil BenchMark IHC/ISH. Le tissu de contrôle négatif doit être coloré à l'aide de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) afin de s'assurer que le démasquage antigénique et les autres procédures de prétraitement n'ont pas produit de faux positifs à la coloration.

MATERIEL FOURNI

L'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) contient suffisamment de réactif pour 50 tests.

Un distributeur de 5 mL d'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) contient environ 30 µg d'anticorps monoclonal de lapin dirigé contre l'antigène HER2 humain.

L'anticorps est dilué dans un tampon salin 0.05 M Tris renfermant 0.01 M EDTA, 0.05 % de Brij-35, 0.3 % de protéine de transport et 0.05 % d'azoture de sodium, un conservateur. Il contient des traces de sérum de veau fœtal (environ 0.25 %) provenant de la solution mère.

La concentration en anticorps spécifique est d'environ 6 µg/mL. L'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) est une IgG de lapin diluée préparée à partir de surnageants de cultures tissulaires.

Consulter la fiche technique du kit de détection VENTANA approprié pour une description détaillée des points suivants : principe de la procédure, matériels et méthodes, prélèvement et préparation des échantillons pour l'analyse, procédures de contrôle qualité, résolution des problèmes, interprétation des résultats et limites.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Les réactifs de coloration tels que les kits de détection et les composants accessoires VENTANA, y compris les lames de tissu de contrôle négatif et positif, ne sont pas fournis.

Il est possible que certains produits indiqués dans la fiche technique ne soient pas disponibles dans certains pays. Contacter un représentant du service client local.

Les réactifs et le matériel suivants peuvent être nécessaires pour la coloration, mais ne sont pas fournis :

1. Tissus de contrôle recommandés
2. Lames de microscope chargées positivement
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (réf. 790-4795 / 06683380001)
4. *ultra*View DAB Detection Kit (réf. 760-500 / 05269806001)
5. *i*VIEW DAB Detection Kit (réf. 760-091 / 05266157001 [50 tests])
6. EZ Prep Concentrate (10X) (réf. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (réf. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (réf. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (réf. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (réf. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (réf. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (réf. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (réf. 760-2037 / 05266769001)
14. Matériel courant de laboratoire
15. Appareil BenchMark IHC/ISH

CONSERVATION ET STABILITE

Conserver le produit entre 2 et 8 °C dès réception et lorsqu'il n'est pas utilisé. Ne pas congeler.

Pour assurer une distribution correcte du réactif et la stabilité de l'anticorps, remettre le capuchon sur le distributeur après chaque utilisation et ranger immédiatement celui-ci en position verticale dans le réfrigérateur.

Chaque distributeur d'anticorps comporte une date d'expiration. Lorsqu'il est correctement conservé, le réactif reste stable jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date d'expiration.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les tissus FFPE préparés en routine sont adaptés à la coloration à l'aide de cet anticorps primaire lorsque celui-ci est utilisé avec les kits de détection VENTANA et les appareils BenchMark IHC/ISH. Il est recommandé de fixer les tissus au formol neutre tamponné à 10 %.[22] Les lames doivent être colorées immédiatement, car l'antigénicité des coupes de tissu peut diminuer avec le temps.

Il est recommandé de tester des contrôles positifs et négatifs en même temps que les échantillons inconnus.

Les coupes doivent faire une épaisseur d'environ 4 µm et être montées sur des lames d'histologie. Les lames doivent être des lames Superfrost Plus ou des lames équivalentes. Des études indiquent que les coupes de tissus et de lignées cellulaires qui ont séché à l'air libre et sont conservées entre 2 et 8 °C sont stables jusqu'à six mois. Chaque laboratoire doit valider la stabilité des coupes sur lame pour ses propres procédures et conditions ambiantes de conservation.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro (IVD).
2. Pour utilisation professionnelle uniquement.
3. **ATTENTION** : Aux États-Unis, la loi fédérale stipule que ce produit peut être vendu uniquement par un médecin ou sur prescription médicale. (Rx Only)
4. Ne pas utiliser au-delà du nombre de tests indiqué.
5. Les conditions ambiantes peuvent affecter les lames chargées positivement et conduire à une coloration inappropriée. Un représentant Roche pourra fournir plus d'informations sur l'utilisation de ces types de lames.
6. L'utilisation de ce produit pour la sélection des patients éligibles à un traitement par KADCYLA ou PERJETA peut ne pas être disponible dans toutes les régions. Consulter le représentant Roche local pour vérifier la disponibilité dans des régions spécifiques.
7. Les produits d'origine humaine ou animale doivent être manipulés comme susceptibles de présenter un danger biologique et être éliminés en prenant les précautions appropriées. En cas d'exposition à un tel produit, il convient de respecter les directives des autorités de santé compétentes.[23,24]
8. Éviter tout contact des yeux et des membranes muqueuses avec les réactifs. Si des réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.
9. Éviter toute contamination microbienne des réactifs, car cela pourrait entraîner des résultats erronés.
10. Ce produit n'est pas classé comme substance dangereuse s'il est utilisé conformément au mode d'emploi. Le conservateur contenu dans le réactif est l'azoture de sodium. Les symptômes d'une surexposition à l'azoture de sodium incluent l'irritation de la peau, des yeux, des membranes muqueuses et des voies respiratoires supérieures. La concentration en azoture de sodium dans ce produit est de 0.05 % et ne correspond pas aux critères définis pour une substance dangereuse. En cas d'accumulation, le NaN3 peut réagir avec les canalisations en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de son élimination, faire couler un grand volume d'eau pour empêcher l'accumulation d'azoture dans les canalisations.[25] Les individus sensibles peuvent développer des réactions allergiques systémiques.
11. Pour plus d'informations sur l'utilisation de ce produit, se référer au guide d'utilisation de l'appareil BenchMark IHC/ISH et au mode d'emploi de tous les composants nécessaires à l'adresse dialog.roche.com.
12. Consulter les autorités locales et/ou nationales pour connaître la méthode d'élimination recommandée.
13. L'étiquetage de sécurité des produits suit principalement les directives SGH de l'UE. La fiche de données de sécurité est disponible sur demande pour les utilisateurs professionnels.
14. Pour signaler toute suspicion d'événement grave lié à ce dispositif, contacter un représentant Roche local et l'autorité compétente de l'État membre ou du pays dans lequel le dispositif est utilisé.

PROCEDURE DE COLORATION

Les anticorps primaires VENTANA ont été développés pour être utilisés sur les appareils BenchMark IHC/ISH en association avec les kits de détection et les accessoires VENTANA. Se reporter aux tableaux ci-dessous pour les protocoles de coloration recommandés.

Cet anticorps a été optimisé pour des temps d'incubation spécifiques, mais l'utilisateur doit valider les résultats obtenus avec ce réactif.

Les paramètres des procédures automatisées peuvent être affichés, imprimés et modifiés conformément à la procédure décrite dans le guide d'utilisation de l'appareil. Pour plus de détails sur les procédures de coloration par immunohistochimie, consulter la fiche technique du kit de détection VENTANA approprié.

Pour de plus amples informations sur l'utilisation appropriée de ce dispositif, consulter la fiche technique du distributeur de réactif associée à la référence 790-4493.

Tableau 1. Protocole de coloration recommandé pour l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

Type de procédure	Méthode		
	GX	XT	ULTRA
Déparaffinage	Sélectionné	Sélectionné	Sélectionné
Démasquage cellulaire (démasquage antigénique)	CC1, standard	CC1, standard	ULTRA CC1, léger
Anticorps (primaire)	32 minutes, 37 °C	32 minutes, 37 °C	24 minutes, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	Non sélectionné	Sélectionné	Sélectionné
Contre-coloration	Hematoxylin II, 4 minutes		
Après contre-coloration	Bluing, 4 minutes		

Tableau 2. Protocole de coloration recommandé pour l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

Type de procédure	Méthode		
	GX	XT	ULTRA ou ULTRA PLUS
Déparaffinage	Sélectionné	Sélectionné	Sélectionné
Démasquage cellulaire (démasquage antigénique)	CC1, léger	CC1, léger	ULTRA CC1, Léger
Anticorps (primaire)	16 minutes, 37 °C	16 minutes, 37 °C	12 minutes, 36 °C
ultraWash	Sélectionné		
Contre-coloration	Hematoxylin II, 4 minutes		
Après contre-coloration	Bluing, 4 minutes		

En raison d'une certaine variabilité de la fixation et de la préparation des tissus ainsi que des conditions générales ambiantes du laboratoire et des appareils utilisés, il peut être nécessaire d'augmenter ou de diminuer la durée d'incubation de l'anticorps primaire ou du démasquage cellulaire en fonction des échantillons, de la méthode de détection utilisée et des préférences du lecteur des lames. Pour de plus amples informations sur les variables de fixation, consulter l'ouvrage « Immunohistochemistry Principles and Advances ».[26]

Les procédures de coloration recommandées pour le carcinome du sein et le carcinome gastrique se trouvent dans le Tableau 3.

Tableau 3. Procédures de coloration sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

	GX	XT	ULTRA ou ULTRA PLUS
Carcinome du sein	Procédure de coloration pour l'*i*VIEW DAB ou l'*ultra*View DAB*	Procédure de coloration pour l'*i*VIEW DAB ou l'*ultra*View DAB*	Procédure de coloration pour l'*i*VIEW DAB ou l'*ultra*View DAB*
Carcinome gastrique	GX uVDAB HER2 4B5 Gastric (Tableau 2)	XT uVDAB HER2 4B5 Gastric (Tableau 2)	ULTRA uVDAB HER2 4B5 Gastric (Tableau 2)

* Les échantillons de carcinome du sein colorés sur les appareils BenchMark IHC/ISH sont colorés selon les procédures de coloration prévues pour l'*i*VIEW DAB Detection Kit (Tableau 1) ou l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit (Tableau 2)

PROCEDURES DE CONTROLE QUALITE

Lignées cellulaires de contrôle au niveau du système

Ventana propose en tant que produit séparé quatre lignées cellulaires de contrôle fixées au formol, incluses en paraffine, sectionnées et montées sur des lames chargées positivement. Les PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (P/N 781-2991) peuvent s'avérer utiles pour la validation préalable de la méthode de traitement utilisée pour la coloration des lames avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). La caractérisation du nombre de copies de gène de ces quatre lignées cellulaires de contrôle a été effectuée par hybridation in situ (tableau 4). Si elles sont traitées et colorées de façon appropriée, les lignées cellulaires doivent présenter la coloration décrite dans la fiche technique des PATHWAY Her-2 4 in 1 Control Slide. Si la coloration indiquée n'est pas évidente dans les contrôles appropriés, notamment les contrôles avec des scores de 1+ et 2+, la coloration des tissus doit être répétée.

Tableau 4. Caractéristiques des PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

Score HER2 par IHC	Lignée cellulaire	Rapport HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* Le rapport HER2/Chr17 est la moyenne des rapports des signaux d'hybridation in situ fluorescente (FISH) de trois lots de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

TISSU DE CONTROLE POSITIF

Un tissu de contrôle positif, fixé et préparé de la même manière que les échantillons des patients, doit être inclus pour chaque ensemble de conditions de tests et pour chaque procédure de coloration exécutée à l'aide de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). Il est considéré comme bonne pratique de laboratoire d'inclure une coupe de tissu de contrôle positif sur la même lame que le tissu à tester. Cela permet d'identifier tout problème d'application des réactifs sur la lame. Un tissu qui présente une coloration positive faible est le mieux adapté pour le contrôle qualité. Le tissu de contrôle peut comprendre à la fois des éléments positifs et des éléments négatifs à la coloration et peut servir à la fois de tissu de contrôle positif et négatif. Le tissu de contrôle doit être un échantillon fraîchement prélevé lors d'une autopsie, d'une biopsie ou d'une intervention chirurgicale et préparé ou fixé dès que possible après le prélèvement et de manière identique aux coupes à tester.

Un tel tissu peut servir de contrôle à toutes les étapes de l'analyse, de la préparation des tissus à leur coloration. L'utilisation d'une coupe de tissu fixée ou préparée d'une autre manière que l'échantillon à tester sert de contrôle pour tous les réactifs et toutes les étapes de la méthode, sauf la fixation et la préparation du tissu. Idéalement, un tissu dont on sait qu'il présente une coloration faible mais positive doit être choisi pour s'assurer que le système est suffisamment sensible aux faibles degrés de dégradation des réactifs ou aux problèmes liés à la méthodologie de l'IHC. Un tissu néoplasique HER2 positif est toutefois généralement fortement positif en raison de la nature de la pathologie (surexpression).

Des tissus de contrôle positif connus doivent être utilisés uniquement pour vérifier les performances des réactifs et des appareils, et non comme une aide à la formulation d'un diagnostic spécifique sur les échantillons testés. Si les tissus de contrôle positif ne présentent pas de coloration positive, les résultats de l'échantillon testé doivent alors être considérés comme non valides.

Du tissu de carcinome gastrique ou de carcinome invasif du sein, dont la faible positivité (pour HER2 dans le cas carcinome invasif du sein) est connue, est un exemple de contrôle positif pour l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). Les composants tissulaires positifs (coloration membranaire des cellules néoplasiques) permettent de confirmer que l'anticorps a bien été appliqué et que l'appareil fonctionne correctement.

Tissu de contrôle négatif

La lame de tissu utilisée comme tissu de contrôle positif (carcinome invasif du sein canalaire ou lobulaire, ou carcinome gastrique) peut aussi être utilisée comme tissu de

contrôle négatif. Les composants devant être négatifs à la coloration (stroma, cellules lymphoïdes et vaisseaux sanguins environnants) doivent présenter une absence de coloration spécifique et donner une indication du bruit de fond de coloration spécifique (faux positif) avec l'anticorps primaire. Utiliser un tissu négatif connu, fixé, préparé et inclus de la même façon que le ou les échantillons des patients.

Réactif de contrôle négatif

Une lame doit être colorée avec un réactif de contrôle négatif approprié pour chaque échantillon afin de faciliter l'interprétation des résultats. Un réactif de contrôle négatif est utilisé à la place de l'anticorps primaire afin d'évaluer la coloration non spécifique. La lame doit être colorée avec le CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La durée d'incubation du réactif de contrôle négatif doit être identique à celle de l'anticorps primaire.

Écarts inexpliqués

Signaler immédiatement à un représentant du service client local les écarts inexpliqués observés avec les contrôles. Si les résultats des contrôles qualité ne sont pas conformes aux spécifications, les résultats des patients sont non valides. Consulter la rubrique Résolution des problèmes. Identifier et corriger le problème, puis répéter la coloration des échantillons des patients.

Vérification du test

Avant la première utilisation d'un anticorps ou d'un système de coloration dans une procédure de diagnostic, la spécificité du test doit être vérifiée en le testant sur une série de tissus positifs et négatifs aux caractéristiques de performances immunohistochimiques connues (consulter les Procédures de contrôle qualité précédemment décrites dans cette notice, les recommandations pour les contrôles qualité du College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, l'Anatomic Pathology Checklist[27] ou des directives CLSI Approved Guideline[28]). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou chaque fois qu'un paramètre du test est modifié. Les tissus cancer du sein ou de l'estomac dont le statut HER2 est connu sont appropriés pour la vérification du test.

INTERPRETATION DE LA COLORATION / RESULTATS ATTENDUS

La procédure d'immunocoloration automatisée de VENTANA entraîne la précipitation d'un produit de réaction de couleur brune (DAB) au niveau des sites antigéniques localisés par l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). Un anatomopathologiste qualifié, expert en procédures immunohistochimiques, doit évaluer les contrôles ainsi que la qualité de la coloration avant d'interpréter les résultats.

Contrôles positifs

La coloration du tissu de contrôle positif doit être examinée en premier pour s'assurer que tous les réactifs fonctionnent correctement. La présence d'un produit de réaction convenablement coloré au niveau de la membrane des cellules cibles indique une réactivité positive. En fonction de la durée d'incubation et de la concentration de l'hématoxyline utilisée, la contre-coloration génère une coloration bleu pâle à bleu foncé du noyau des cellules. Une contre-coloration incomplète ou excessive peut compromettre l'interprétation des résultats.

Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, les résultats obtenus avec les échantillons testés doivent alors être considérés comme non valides.

Tissus de contrôle négatif

Le tissu de contrôle négatif doit être examiné après le tissu de contrôle positif pour vérifier le marquage spécifique de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif confirme l'absence de réaction croisée de l'anticorps avec des cellules ou des éléments cellulaires. Si ce tissu est contre-coloré, une certaine coloration peut être présente à la périphérie de la cellule, dans les espaces interstitiels. Si le tissu de contrôle négatif présente une coloration spécifique, les résultats de l'échantillon du patient doivent être considérés comme non valides.

Réactifs de contrôle négatif

Une coloration non spécifique, si elle est présente, aura un aspect diffus. Une légère coloration sporadique du tissu conjonctif peut aussi être observée dans les coupes de tissus dont la fixation au formol a été trop longue. L'interprétation des résultats de la coloration ne doit porter que sur les cellules intactes, car les cellules nécrotiques ou dégénérées présentent souvent une coloration non spécifique.

Tissu des patients

Les échantillons des patients doivent être examinés en dernier. L'intensité de la coloration positive doit être évaluée par rapport au bruit de fond de coloration obtenu avec le réactif de contrôle négatif. Comme pour tout test d'immunohistochimie, un résultat négatif indique uniquement que l'antigène en question n'a pas été détecté, pas qu'il est absent des cellules ou du tissu analysés. Lors de l'interprétation de tout résultat d'immunohistochimie, la morphologie de chaque échantillon de tissu doit également être examinée à l'aide d'une lame colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. Les caractéristiques morphologiques et les données cliniques pertinentes du patient doivent être interprétées par un anatomopathologiste qualifié.

Un anatomopathologiste qualifié, expert en procédures immunohistochimiques, doit évaluer les contrôles positifs et négatifs ainsi que la qualité de la coloration avant d'interpréter les résultats.

Conventions pour la détermination du score pour l'interprétation de la coloration avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) dans le carcinome du sein

Les carcinomes du sein considérés comme positifs pour la surexpression de la protéine HER2 doivent satisfaire aux critères de seuil d'intensité de la coloration (2+ ou supérieur sur une échelle allant de 0 à 3+) et de pourcentage de cellules tumorales positives (supérieur à 10 %). La coloration doit également être localisée au niveau de la membrane cellulaire. Une certaine coloration cytoplasmique peut tout de même être présente, mais elle n'est pas prise en compte dans la détermination de la positivité. Prendre soin d'examiner toute la surface de la coupe de tissu et de n'effectuer l'évaluation que sur les zones de tissu bien préservé et correctement coloré. Une coloration sur toute la circonférence de la membrane cytoplasmique correspond à un score d'intensité de « 2+ » ou « 3+ ». Une coloration partielle de la membrane correspond à un score de « 1+ ». Il peut s'avérer nécessaire d'examiner les cas limites à un grossissement de 40× ou supérieur pour faire la distinction entre les intensités de « 1+ » et « 2+ ». Contrairement aux cas avec un score d'intensité de 3+ qui ont un contour très épais, la coloration avec un score de 2+ forme un contour plus net et mieux délimité. Les critères d'évaluation de la coloration sont résumés dans le tableau de référence rapide ci-dessous. Consulter le *guide d'interprétation de la coloration avec le VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pour le carcinome du sein et le carcinome gastrique* (P/N 1012716) pour une description plus détaillée avec des photographies de lames colorées à l'aide de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5).

Tableau 5. Critères d'évaluation de l'intensité et du profil de la coloration de la membrane des cellules de carcinome du sein avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5).

Profil de coloration	Score (à transmettre au médecin traitant)	Évaluation de la coloration pour HER2
Aucune coloration membranaire n'est observée	0	Négatif
Coloration pâle et partielle de la membrane d'un pourcentage quelconque des cellules cancéreuses	1+	Négatif
Coloration complète de la membrane faible à modérée de plus de 10 % des cellules cancéreuses	2+	Équivoque*
Coloration complète et intense de la membrane de plus de 10 % des cellules cancéreuses	3+	Positif

* Test réflexe par ISH recommandé

Conventions pour la détermination du score pour l'interprétation de la coloration avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) dans le carcinome gastrique

Les carcinomes gastriques considérés comme positifs pour la surexpression de la protéine HER2 doivent satisfaire aux critères de seuil d'intensité de la coloration et de profil de coloration de la membrane cytoplasmique (2+ ou supérieur sur une échelle allant de 0 à 3+) et pour le pourcentage de cellules tumorales positives. La coloration doit être localisée au niveau de la membrane cellulaire mais ne doit pas forcément couvrir toute la circonférence de la cellule, étant donné qu'une coloration basolatérale est souvent observée, celle-ci doit être prise en compte pour l'évaluation. Une coloration cytoplasmique ou nucléaire peut être présente, mais elle n'est pas prise en compte dans la détermination de la positivité. Dans le carcinome gastrique, le pourcentage de cellules

tumorales positives diffère selon l'échantillon : ≥ 5 cellules cohésives pour un échantillon de biopsie et ≥ 10 % de cellules pour un échantillon de résection.

Lors de l'établissement des recommandations pour l'évaluation de la positivité pour HER2 par immunohistochimie dans le cancer de l'estomac, il a été noté que si une forte coloration membranaire est un signe de la surexpression de la protéine HER2 dans les cellules néoplasiques, cette coloration n'a pas besoin de couvrir toute la circonférence des cellules.[29]

Dans le cancer de l'estomac, une coloration cytoplasmique diffuse, avec ou sans coloration nucléaire, a été décrite.[30] Seule la coloration membranaire doit être prise en compte pour la détermination de l'expression de la protéine HER2 dans le cancer de l'estomac.

La coloration histochimique avec le clone 4B5 peut produire une coloration cytoplasmique et nucléaire dans la muqueuse gastrique normale et moins fréquemment dans les cellules néoplasiques du carcinome gastrique et du carcinome de la jonction gastro-œsophagienne. La nature de cette coloration cytoplasmique et nucléaire est actuellement inconnue. Ce profil de coloration ne doit pas être confondu avec la coloration membranaire discrète, cette dernière étant indicative d'une positivité pour HER2 des cellules néoplasiques.

Consulter le *guide d'interprétation de la coloration avec le VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pour le carcinome du sein et le carcinome gastrique* pour une description plus détaillée avec des microphotographies de lames colorées à l'aide de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5).

Tableau 6. Critères d'évaluation de l'intensité et du profil de la coloration de la membrane des cellules de carcinome gastrique avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5).

Profil de coloration - échantillon de résection	Profil de coloration - échantillon de biopsie	Score (à transmettre au médecin traitant)	Évaluation de la coloration pour HER2
Aucune réactivité ou réactivité membranaire dans < 10 % des cellules tumorales	Aucune réactivité ou réactivité membranaire dans aucune cellule tumorale	0	Négatif
Réactivité membranaire très faible/à peine perceptible dans ≥ 10 % des cellules tumorales ; seule une partie de la membrane des cellules est réactive	Amas de cellules tumorales* avec une réactivité membranaire très faible/à peine perceptible, quel que soit le pourcentage de cellules tumorales colorées	1+	Négatif
Réactivité membranaire complète, basolatérale ou latérale faible à modérée de ≥ 10 % des cellules tumorales	Amas de cellules tumorales* avec une réactivité membranaire complète, basolatérale ou latérale faible à modérée, quel que soit le pourcentage de cellules tumorales colorées	2+	Équivoque**
Forte réactivité membranaire complète, basolatérale ou latérale de ≥ 10 % des cellules tumorales	Amas de cellules tumorales* avec une forte réactivité membranaire complète, basolatérale ou latérale, quel que soit le pourcentage de cellules tumorales colorées	3+	Positif

* ≥ 5 cellules cohésives

** Test réflexe par ISH recommandé

LIMITES

Limites générales

1. L'immunohistochimie est une procédure de diagnostic à plusieurs étapes nécessitant une formation spécialisée pour le choix des réactifs appropriés, la sélection, la fixation, la préparation des tissus, la préparation des lames d'immunohistochimie et l'interprétation des résultats de la coloration.
2. La coloration du tissu dépend de la manipulation et de la préparation du tissu avant la coloration. Une réalisation incorrecte des étapes de fixation, congélation, décongélation, rinçage, séchage, chauffage, coupe, ou une contamination par d'autres tissus ou liquides, peut entraîner des artéfacts, un piégeage des anticorps ou l'obtention de faux négatifs. Des résultats incohérents peuvent être la conséquence de variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion ou d'irrégularités inhérentes au tissu.
3. Une contre-coloration incomplète ou excessive peut compromettre l'interprétation des résultats.
4. L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être évaluée dans le contexte des antécédents cliniques, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation clinique de toute coloration, ou de son absence, doit être complétée par des examens morphologiques et des contrôles appropriés, ainsi que par d'autres tests diagnostiques. Il est de la responsabilité d'un anatomopathologiste qualifié de se familiariser avec les anticorps, les réactifs et les méthodes utilisés pour interpréter la préparation colorée. La coloration doit être réalisée dans un laboratoire autorisé et accrédité, sous le contrôle d'un anatomopathologiste responsable de l'examen des lames colorées et de l'adéquation des contrôles positif et négatif.
5. Les anticorps et les réactifs VENTANA sont fournis à la dilution optimale pour une utilisation conforme aux instructions fournies. Tout écart par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus. Des contrôles appropriés doivent être utilisés et documentés. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients.
6. Ce produit n'est pas conçu pour être utilisé en cytométrie de flux ; les caractéristiques de performances n'ont pas été déterminées.
7. Les réactifs peuvent produire des réactions inattendues sur des tissus qui n'ont pas été testés auparavant. La possibilité d'obtenir des réactions inattendues, même sur des groupes de tissus déjà testés, ne peut pas être complètement exclue en raison de la variabilité biologique de l'expression de l'antigène dans les néoplasmes ou d'autres tissus pathologiques.[31] Contacter le représentant du service client local avec les réactions inattendues documentées.
8. Les tissus de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) peuvent développer une coloration non spécifique avec la peroxydase de raifort.[32]
9. Des faux positifs peuvent se présenter en raison de liaisons non immunologiques des protéines ou des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par une activité pseudoperoxydasique (érythrocytes), une activité de la peroxydase endogène (cytochrome C) ou la biotine endogène (par exemple : foie, cerveau, sein ou rein) selon la méthode d'immunocoloration utilisée.[33]
10. Comme pour tout test d'immunohistochimie, un résultat négatif indique uniquement que l'antigène n'a pas été détecté, pas qu'il est absent des cellules ou des tissus analysés.

LIMITES SPECIFIQUES

Cet anticorps a été optimisé comme indiqué dans le Tableau 1 et le Tableau 2 pour les systèmes de détection chimique et les appareils BenchMark IHC/ISH. En raison d'une certaine variabilité de la fixation et de la préparation des tissus, il peut s'avérer nécessaire d'augmenter ou de diminuer la durée d'incubation de l'anticorps primaire pour des échantillons particuliers. Pour de plus amples informations sur les variables de fixation, consulter l'ouvrage « Immunohistochemistry Principles and Advances ».[26]

L'anticorps, utilisé en association avec les kits de détection et les accessoires VENTANA, détecte l'antigène qui résiste aux conditions habituelles de fixation au formol, de préparation et de coupe des tissus. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation et de la validation des résultats des patients.

La spécificité de la coloration sur la moelle osseuse n'a pas été testée. L'utilisateur doit déterminer la coloration appropriée dans les tissus ci-dessus avant l'interprétation des résultats de la coloration.

La coloration histochimique avec le clone 4B5 peut produire une coloration cytoplasmique et nucléaire dans la muqueuse gastrique normale et, moins fréquemment, dans les cellules néoplasiques du carcinome gastrique et du carcinome de la jonction gastro-œsophagienne. La nature de cette coloration cytoplasmique et nucléaire est actuellement inconnue. Ce profil de coloration ne doit pas être confondu avec la coloration membranaire discrète qui indique une positivité pour HER2 des cellules néoplasiques.

Tous les tests ne sont pas forcément enregistrés sur chaque appareil. Contacter votre représentant Roche local pour plus d'informations.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Des tests de coloration ont été réalisés pour évaluer la sensibilité, la spécificité et la précision. Leurs résultats sont présentés ci-dessous.

PERFORMANCES ANALYTIQUES

Sensibilité et spécificité

La sensibilité et la spécificité de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) ont été déterminées par une étude qui n'a révélé aucune coloration membranaire spécifique dans la plupart des tissus normaux. Les résultats de coloration sont indiqués dans le Tableau 7. La sensibilité et la spécificité de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) ont aussi été déterminées par une étude qui n'a révélé aucune coloration membranaire spécifique dans la plupart des tissus néoplasiques. Les résultats de coloration sont indiqués dans le Tableau 8. La coloration pour l'étude de sensibilité et de spécificité a été effectuée à l'aide de l'un des protocoles indiqués précédemment, c'est-à-dire le protocole de l'*i*VIEW DAB Detection Kit sur un appareil BenchMark XT ou le protocole de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit sur un appareil BenchMark ULTRA.

La coloration positive est conforme à l'expression d'HER2 décrite dans la littérature dans les tissus suivants : épithélium amygdalien, épithélium œsophagien, prostate, nerf périphérique, parathyroïde, cancer du sein, côlon et cancer de l'ovaire.

Tableau 7. Sensibilité et spécificité de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) déterminées par coloration de tissus normaux FFPE.

Tissu	Nbre de positifs/nbre total	Tissu	Nbre de positifs/nbre total
Cerveau	0/6	Intestin grêle	0/6
Cervelet	0/6	Côlon	0/46
Glande surrénale	0/6	Foie	0/6
Ovaire	0/6	Glande salivaire	0/3
Pancréas	0/6	Langue	0/3
Ganglion lymphatique	0/12	Rein	0/6
Hypophyse	0/5	Prostate	1/6
Testicule	0/6	Vessie [b]	3/3
Thyroïde	0/6	Rectum	0/6
Sein	0/14	Parathyroïde [c]	4/6
Rate	0/6	Endomètre	0/3
Amygdale [a]	3/6	Utérus	0/3
Thymus	0/5	Col de l'utérus	0/5
Moelle osseuse	0/3	Endocol	0/1
Poumon	0/6	Muscle squelettique	0/6
Cœur	0/5	Peau	0/6
Péricarde	0/3	Nerf	2/6
Œsophage	1/6	Mésothélium	0/3
Estomac	0/11	S.o.	S.o.

[a] Coloration focale des cellules épithéliales de surface

[b] Coloration membranaire des cellules en parapluie superficielles

[c] Coloration membranaire focale

Tableau 8. Sensibilité et spécificité de l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5) déterminées par coloration de divers tissus néoplasiques FFPE.

Pathologie	Nbre de positifs/nbre total
Glioblastome (cerveau)	0/2
Méningiome (cerveau)	0/1
Oligodendrogliome (cerveau)	0/1
Adénocarcinome séreux (ovaire)	0/2
Carcinome, SAI ((sans autre indication) (ovaire)	1/2
Néoplasme neuroendocrine (pancréas)	0/1
Adénocarcinome (pancréas)	0/1
Carcinome, SAI (pancréas)	0/3
Séminome (testicule)	0/1
Carcinome embryonnaire (testicule)	0/1
Carcinome médullaire (thyroïde)	0/1
Carcinome papillaire (thyroïde)	0/1
Carcinome, SAI (thyroïde)	0/3
Carcinome canalaire micro-invasif (sein)	2/2
Carcinome canalaire invasif (sein)	44/99
Carcinome, SAI (sein)	1/4
Carcinome à petites cellules (poumon)	0/1
Carcinome épidermoïde (poumon)	0/1
Carcinome, SAI (poumon)	0/2
Adénocarcinome (poumon)	0/1
Carcinome épidermoïde (œsophage)	0/1
Adénocarcinome (œsophage)	0/1
Adénocarcinome mucineux (estomac)	0/4
Adénocarcinome (estomac)	8/88
Carcinome à cellules en bague à chaton (estomac)	0/4
Carcinome, SAI (estomac)	0/3
Adénocarcinome (intestin grêle)	0/1
Tumeur stromale gastro-intestinale (intestin grêle)	0/1
Adénocarcinome (côlon)	0/32

Pathologie	Nbre de positifs/nbre total
Tumeur stromale gastro-intestinale (côlon)	0/1
Carcinome, SAI (côlon)	1/3
Adénocarcinome (rectum)	1/5
Tumeur stromale gastro-intestinale (rectum)	0/1
Mélanome (rectum)	0/1
Carcinome hépatocellulaire (foie)	0/3
Hépatoblastome (foie)	0/1
Carcinome, SAI (foie)	0/3
Carcinome à cellules claires (rein)	0/1
Carcinome, SAI (rein)	0/5
Adénocarcinome (prostate)	0/2
Carcinome, SAI (prostate)	0/3
Léiomyome	0/3
Adénocarcinome (utérus)	0/1
Carcinome à cellules claires (utérus)	0/1
Carcinome épidermoïde (col de l'utérus)	0/2
Rhabdomyosarcome embryonnaire (muscle strié)	0/1
Carcinome basocellulaire (peau)	0/1
Carcinome épidermoïde (peau)	1/1
Neurofibrome (lombaire)	0/1
Neuroblastome (rétropéritoine)	0/1
Mésothéliome (péritoine)	0/1
Rhabdomyosarcome pléomorphe (péritoine)	0/1
Lymphome, SAI	0/3
Lymphome B, SAI (rate)	0/1
Lymphome B, SAI (ganglion lymphatique)	0/2
Lymphome de Hodgkin (ganglion lymphatique)	0/1
Carcinome urothélial (vessie)	1/1
Léiomyosarcome (vessie)	0/1
Ostéosarcome (os)	0/1
Léiomyosarcome (muscle lisse)	0/1
Adénocarcinome du rectum (métastatique)	0/1
Adénocarcinome du côlon (métastatique)	0/7
Adénocarcinome mucineux du côlon (métastatique)	0/1
Mélanome	0/2
Néoplasme neuroendocrine, SAI	0/2
Sarcome, SAI	0/2
Carcinome indifférencié, SAI	0/1

Performances analytiques sur des cas mammaires

Caractéristiques de performances sur l'appareil BenchMark ULTRA à l'aide de l'*i*VIEW DAB Detection Kit ou de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit

Reproductibilité de la coloration interjours et interlaboratoires sur l'appareil BenchMark ULTRA : trois laboratoires de trois établissements différents situés aux États-Unis ont participé à l'étude de reproductibilité interlaboratoires. Des lames de 48 cas de carcinomes invasifs du sein FFPE [12 cas par niveau d'expression de HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] et une paire de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides pour chacun des 12 cycles de coloration ont été distribuées aux centres de l'étude pour coloration sur un appareil BenchMark ULTRA à l'aide du protocole de coloration recommandé et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient les PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides et une deuxième lame de chaque cas colorée avec une Ig de contrôle négatif. Les anatomopathologistes, tenus dans l'ignorance du statut des cas, ont évalué les lames et attribué un score clinique (0, 1+, 2+, 3+) Les résultats ont été analysés par Ventana. En suivant la nomenclature usuelle pour les tableaux 2 × 2, la concordance positive moyenne (APA) entre les centres a été calculé selon la formule [2a/(2a+b+c)] et la concordance négative moyenne (ANA) selon la formule [2d/(2d+b+c)]. Entre tous les centres, l'APA intercentres basé sur l'évaluation clinique (positif, négatif) était de 90.0 % (108/120) et l'ANA était de 92.9 % (156/168). Pour les comparaisons par paires de centres, l'APA a été calculé selon la formule a/(a+c) et l'ANA selon la formule d/(b+d). Les APA intercentres étaient de, respectivement, 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) et 89.5 % (34/38) entre le centre A et le centre B, le centre A et le centre C et le centre B et le centre C. Les ANA intercentres étaient de, respectivement, 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) et 93.1 % (54/58) entre le centre A et le centre B, le centre A et le centre C et le centre B et le centre C.

Les tableaux ci-dessous sont des représentations 3 × 3 des scores cliniques attribués par chaque lecteur dans lesquelles les scores 2+ et 3+ ont été séparés.

Tableau 9. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interlaboratoires entre le centre A et le centre B : clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Centre B			
Centre A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Total	12	9	27	48
Taux de concordance globale (OPA) : n/N (%)	43/48 (**89.6**)			

Tableau 10. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interlaboratoires entre le centre A et le centre C : clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Centre C			
Centre A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Total	12	5	31	48

	Centre C			
Centre A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
Taux de concordance globale (OPA) : n/N (%)			42/48 (**87.5**)	

Tableau 11. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interlaboratoires entre le centre B et le centre C : clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit.

	Centre C			
Centre B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Total	12	5	31	48
Taux de concordance globale (OPA) : n/N (%)			44/48 (**91.7**)	

Reproductibilité interjours de la coloration sur l'appareil BenchMark ULTRA

La partie reproductibilité interjours de l'étude comprenait 12 cas avec une distribution prévue d'environ trois (3) cas pour chaque score clinique (0, 1+, 2+, 3+). Au total, les cinq cycles sur l'appareil BenchMark ULTRA dans le seul établissement (le centre C) ayant mené la partie reproductibilité interjours de l'étude ont été exécutés sur un minimum de 20 jours, de façon à ce qu'il n'y ait jamais deux jours de coloration consécutifs. Pour la reproductibilité interjours, d'après les évaluations cliniques des lames colorées à l'aide du clone 4B5, l'APA et l'ANA entre les colorations réalisées lors des différents jours au centre C étaient de 100 %. D'après les scores cliniques, les taux de concordance globale (OPA) pour les comparaisons interjours étaient de 100 % pour chaque comparaison d'un jour à l'autre et pour l'ensemble des jours combinés.

Étude de comparaison entre l'appareil BenchMark ULTRA et l'appareil BenchMark XT

Deux laboratoires de coloration et trois centres d'évaluation aux États-Unis ont participé à l'étude de comparaison des plateformes. Des lames de 280 cas de carcinomes invasifs du sein FFPE (environ 70 cas pour chaque niveau d'expression de HER2 [0, 1+, 2+, 3+]) ont été réparties de façon aléatoire entre les deux centres de coloration (140 cas pour chaque centre) pour coloration sur un appareil BenchMark XT et un appareil BenchMark ULTRA à l'aide des protocoles de coloration recommandés et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient les PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides et une deuxième lame de chaque cas colorée avec une Ig de contrôle négatif. Les cas colorés au centre 1 et au centre 2 ont été divisés en quatre groupes de lames et transmis, à raison d'un groupe à la fois, à trois lecteurs qualifiés (anatomopathologistes), dont un lecteur au centre 1, un au centre 2 et un au centre 3. Les anatomopathologistes, tenus dans l'ignorance du statut des cas et de la plateforme de coloration utilisée, ont évalué les quatre groupes de lames et attribué un score clinique (0, 1+, 2+, 3+) pour chaque cas. Les résultats ont été analysés par Ventana. D'après les évaluations cliniques des cas (positif, négatif), les PPA (et la limite inférieure des intervalles de confiance bilatéraux à 95 %) entre les colorations réalisées sur l'appareil BenchMark ULTRA et sur l'appareil BenchMark XT à l'aide de l'anticorps monoclonal 4B5 étaient de, respectivement, 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) et 94.9 % (89.3) pour les lecteurs A, B et C. Toujours d'après les évaluations cliniques des cas (positif, négatif), les NPA (et la limite inférieure des intervalles de confiance bilatéraux à 95 %) entre les colorations réalisées sur l'appareil BenchMark ULTRA et sur l'appareil BenchMark XT à l'aide de l'anticorps monocmonal 4B5 étaient de, respectivement, 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) et 99.3 % (96.3) pour les lecteurs A, B et C. D'après l'analyse 2 × 2 des évaluations cliniques (positif, négatif), l'OPA entre les colorations réalisées sur l'appareil BenchMark ULTRA et sur l'appareil BenchMark XT à l'aide de l'anticorps monoclonal 4B5 était de, respectivement, 91.8, 92.5 et 97.4 % pour les lecteurs A, B et C. Les représentations 3 × 3 des taux de concordance interplateformes basés sur les scores cliniques (0/1+, 2+, 3+) attribués par chaque lecteur se trouvent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 12. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interplateformes entre les appareils BenchMark ULTRA et BenchMark XT : lecteur A.

Appareil BenchMark ULTRA	**Appareil BenchMark XT**			
Lecteur A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Total	96	47	124	267
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)			226/267 (**84.6**) (79.8-88.5)	

Tableau 13. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interplateformes entre les appareils BenchMark ULTRA et BenchMark XT : lecteur B.

Appareil BenchMark ULTRA	**Appareil BenchMark XT**			
Lecteur B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Total	69	68	130	267
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)			242/267 (**90.6**) (86.5-93.6)	

Tableau 14. Analyse 3 × 3 des taux de concordance interplateformes entre les appareils BenchMark ULTRA et BenchMark XT : lecteur C.

Appareil BenchMark ULTRA	**Appareil BenchMark XT**			
Lecteur C	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Total	66	52	149	267
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)			257/267 (**96.3**) (93.2-98.0)	

Reproductibilité interanatomopathologistes des résultats des échantillons de l'étude de comparaison des appareils

Les taux de concordance positive et négative avec les intervalles de confiance bilatéraux à 95 % ont été calculés pour les six comparaisons par paires possibles entre les lecteurs pour chaque plateforme.

Pour l'appareil BenchMark ULTRA, les PPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) et 83.5 % (111/133). Les NPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) et 98.5 % (132/134). L'OPA était le plus élevé entre le lecteur A et le lecteur B (91.8 %), et il était plus faible entre le lecteur B et le lecteur C (91.0 %) ainsi qu'entre le lecteur A et le lecteur C (88.8 %).

Pour l'appareil BenchMark XT, les PPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) et 84.7 % (116/137). Les NPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) et 98.5 % (128/130). L'OPA était le plus élevé entre le lecteur A et le lecteur B (92.5%), et il était plus faible entre le lecteur B et le lecteur C (91.4 %) ainsi qu'entre le lecteur A et le lecteur C (89.1%).

Étude de comparaison entre l'*i*VIEW DAB Detection Kit et l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit

La cohorte de 140 cas de carcinomes invasifs du sein FFPE du centre 1 (environ 35 cas de chaque niveau d'expression de HER-2 [0, 1+, 2+, 3+]) a été utilisée dans une étude de comparaison entre l'*i*VIEW DAB Detection Kit et l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit lorsque ces kits sont utilisés pour la coloration à l'aide du clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA. Un laboratoire de coloration unique et trois centres d'évaluation aux États-Unis ont participé à l'étude de comparaison des kits de détection. D'après les évaluations cliniques (positif, négatif) des lecteurs, pour la coloration à l'aide de l'anticorps monoclonal 4B5 sur l'appareil BenchMark ULTRA, les PPA entre les résultats obtenus à l'aide des méthodes de l'*i*VIEW DAB Detection Kit et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit étaient de, respectivement, 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) et 96.5 % (55/57) pour les lecteurs A, B et C, et les NPA entre ces méthodes de détection étaient de, respectivement, 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) et 97.5 % (77/79) pour les lecteurs A, B et C. Les OPA entre les kits de détection étaient de, respectivement, 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) et 97.1 % (132/136) pour les lecteurs A, B et C. Les représentations 3 × 3 des taux de concordance entre les deux méthodes de détection basés sur les scores cliniques (0/1+, 2+, 3+) attribués par chaque lecteur se trouvent dans les tableaux ci-dessous

Tableau 15. Analyse 3 × 3 des taux de concordance entre l'*i*VIEW DAB Detection Kit et l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit pour le lecteur A : coloration à l'aide du clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA.

***i*VIEW DAB Detection Kit**	***ultra*View Universal DAB Detection Kit**			
Lecteur A	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Total	46	25	65	136
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)	119/136 (**87.5**) (80.9-92.0)			

Tableau 16. Analyse 3 × 3 des taux de concordance entre l'*i*VIEW DAB Detection Kit et l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit pour le lecteur B : coloration à l'aide du clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA.

***i*VIEW DAB Detection Kit**	***ultra*View Universal DAB Detection Kit**			
Lecteur B	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Total	33	32	71	136
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)	128/136 (**94.1**) (88.8-97.0)			

Tableau 17. Analyse 3 × 3 des taux de concordance entre l'*i*VIEW DAB Detection Kit et l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit pour le lecteur C : coloration à l'aide du clone 4B5 sur un appareil BenchMark ULTRA.

***i*VIEW DAB Detection Kit**	***ultra*View Universal DAB Detection Kit**			
Lecteur C	**3+**	**2+**	**0, 1+**	**Total**
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Total	32	25	79	136
Taux de concordance globale : n/N (%) (CI à 95 %)	132/136 (**97.1**) (92.7-98.9)			

Reproductibilité interanatomopathologistes des résultats des échantillons de l'étude de comparaison des méthodes de détection :

Les taux de concordance positive et négative avec les intervalles de confiance bilatéraux à 95 % ont été calculés pour les six comparaisons par paires possibles entre les lecteurs pour chaque méthode.

Pour l'*i*VIEW DAB Detection Kit, les PPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) et 79.7 % (55/69). Les NPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) et 97.0 % (65/67). Le taux de concordance globale était le plus élevé entre le lecteur A et le lecteur B (96.3 %), et il était plus faible entre le lecteur A et le lecteur C (86.0 %) ainsi qu'entre le lecteur B et le lecteur C (88.2 %).

Pour l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, les PPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) et 86.2 % (56/65). Les NPA entre les lecteurs A et B, A et C, B et C, B et A, C et A et C et B étaient de, respectivement, 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) et 98.6 % (70/71). Les taux de concordance globale étaient similaires pour chaque paire de lecteurs, à savoir respectivement 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) et 92.6 % (126/136) pour les comparaisons entre les lecteurs A et B, A et C et B et C.

Études de reproductibilité interlaboratoires et interlecteurs sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit

Trois laboratoires de trois établissements différents situés aux États-Unis ont participé à l'étude de reproductibilité interlaboratoires. Des lames de 28 cas de carcinomes invasifs du sein FFPE [sept cas par niveau d'expression de HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] et une paire de lames de contrôle (une PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide et une lame d'un cas de carcinome du sein de contrôle) pour chacun des 10 cycles de coloration ont été distribuées aux centres de l'étude pour coloration sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS à l'aide du protocole de coloration recommandé et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient une lame PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, un cas de carcinome du sein de contrôle et une deuxième lame de chaque cas colorée avec une Ig de contrôle négatif. Les anatomopathologistes, tenus dans l'ignorance du statut des cas, ont évalué les lames et attribué un score clinique (0, 1+, 2+, 3+). Les résultats ont été analysés par Ventana.

La reproductibilité de la détermination du statut HER2 (positif ou négatif) a été évaluée pour toutes les lames de cas évaluables à l'aide du statut HER2 modal de chaque cas utilisé comme référence pour chaque cas. Pour le calcul des taux de concordance, un score HER2 de 0 ou 1+ était considéré comme étant un statut négatif et un score HER2 de 2+ ou 3+ comme un statut positif. Le statut HER2 modal de chaque cas était le résultat le plus fréquemment observé par les lecteurs (positif ou négatif) pour le cas donné. Toutes les observations obtenues en regroupant tous les centres, lecteurs, jours et cas pour l'ensemble de la population de lames de cas évaluables ont été comparées aux statuts HER2 modaux. Le PPA, le NPA et l'OPA déduits de l'analyse groupée étaient de, respectivement, 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420) et 97.7 % (821/840). La reproductibilité des statuts HER2 a également été évaluée d'après l'APA, l'ANA et l'OPA pour toutes les comparaisons par paire de centres possibles et pour les comparaisons entre tous les centres combinées. Pour la reproductibilité intercentres, l'APA, l'ANA et l'OPA étaient de, respectivement, 95.9, 95.9 et 95.9 %. Pour la reproductibilité

interlecteurs, l'APA, l'ANA et l'OPA étaient de, respectivement, 95.5, 95.5 et 95.5 %. Pour la reproductibilité interjours, l'APA, l'ANA et l'OPA étaient de, respectivement, 97.0, 97.0 et 97.0 %. Les CI à 95 % bilatéraux ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap.

Ces résultats sont présentés dans les tableaux 18 à 21.

Tableau 18. Taux de concordance groupés entre les statuts HER2 et le statut modal de chacun des cas de carcinomes du sein colorés avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS.

Statut HER2	Statut modal sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS		Total
	Positif	Négatif	
Positif	411	10	421
Négatif	9	410	419
Total	420	420	840
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance positive	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Taux de concordance négative	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Taux de concordance globale	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

Tableau 19. Taux de concordance groupés entre les centres déduits des comparaisons par paire des statuts HER2 de cas de carcinomes du sein colorés avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS.

Statut HER2 au centre i	Statut HER2 au centre J		Total
	Positif	Négatif	
Positif	4037	163	4200
Négatif	183	4017	4200
Total	4220	4180	8400
	n/N	% (CI à 95 %)	
Concordance positive moyenne	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Concordance négative moyenne	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Taux de concordance globale	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Remarque : Les centres i et j sont les centres (centre A, centre B et centre C) utilisés dans l'étude. Le taux de concordance groupé est calculé en regroupant toutes les comparaisons possibles entre tous les centres (centre A vs centre B, A vs C et B vs C).

Tableau 20. Taux de concordance groupés interlecteurs déduits des comparaisons par paire des statuts HER2 de cas de carcinomes du sein colorés avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS.

Statut HER2 du lecteur 1	Statut HER2 du lecteur 2		Total
	Positif	Négatif	
Positif	201	9	210
Négatif	10	200	210
Total	211	209	420
	n/N	% (CI à 95 %)	
Concordance positive moyenne	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Concordance négative moyenne	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Taux de concordance globale	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Remarque : Les lecteurs 1 et 2 sont les lecteurs d'un même centre d'étude (centre A, centre B ou centre C) utilisé dans l'étude. Le taux de concordance groupé est calculé en regroupant les taux de concordance entre les lecteurs d'un centre de l'ensemble des centres de l'étude.

Tableau 21. Taux de concordance groupés interjours déduits des comparaisons par paire des statuts HER2 de cas de carcinomes du sein colorés avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS.

Statut HER2 au jour i	Statut HER2 au jour j		Total
	Positif	Négatif	
Positif	817	15	832
Négatif	35	813	848
Total	852	828	1680
	n/N	% (CI à 95 %)	
Concordance positive moyenne	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Concordance négative moyenne	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Taux de concordance globale	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Remarque : Les jours i et j sont les jours de coloration de l'étude (jour 1 à jour 5). Le taux de concordance groupé est calculé en regroupant toutes les comparaisons possibles entre deux jours donnés des statuts attribués par chaque lecteur de chaque centre.

Comparaison des performances de l'anticorps sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et sur l'appareil BenchMark ULTRA

Trois laboratoires, de trois établissements différents situés aux États-Unis, ont participé à une étude de concordance entre l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA. Des lames de 122 cas de carcinomes invasifs du sein FFPE de chaque catégorie de statut HER-2 (0, 1+, 2+, 3+) ont été colorées par Ventana sur un appareil BenchMark ULTRA à l'aide du protocole de coloration recommandé et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient une PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide et une lame de tissu de carcinome du sein de contrôle positif par cycle de coloration. Une deuxième lame de chaque cas a également été colorée avec l'Ig de contrôle négatif. Les lames d'un même cas ont été randomisées et réparties équitablement (40-41 cas/centre) entre les centres de l'étude en vue de leur coloration sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS à l'aide du protocole de coloration recommandé et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient une PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide et une lame de tissu de carcinome du sein de contrôle positif par cycle de coloration. Une deuxième lame de chaque cas a également été colorée avec l'Ig de contrôle négatif. Les anatomopathologistes, tenus dans l'ignorance du statut des cas, ont évalué les lames colorées sur l'appareil BenchMark IHC/ISH et leur ont attribué un score clinique (0, 1+, 2+, 3+). Après deux semaines sans évaluation, les anatomopathologistes ont évalué les lames colorées sur le deuxième appareil BenchMark IHC/ISH. Les résultats ont été analysés par Ventana. Un score HER2 à l'IHC de 0 ou 1+ était considéré comme étant un statut négatif et un score HER2 à l'IHC de 2+ ou 3+ comme un statut positif. L'OPA, le PPA et le NPA étaient de, respectivement, 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) et 89.1 % (179/201). Les CI à 95 % bilatéraux ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap. Les taux d'acceptabilité du bruit de fond et de la morphologie de tous les cas étaient de 100 % avec les deux appareils. Ces résultats sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22. Taux de concordance groupés entre les statuts HER2 déterminés pour des cas de carcinomes du sein colorés avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA.

Statut HER2 avec le BenchMark ULTRA PLUS	Statut HER2 avec le BenchMark ULTRA		
	Positif	Négatif	Total
Positif	154	22	176
Négatif	11	179	190
Total	165	201	366
	n/N	**% (CI à 95 %)**	
Taux de concordance positive	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Taux de concordance négative	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Taux de concordance globale	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

Performances analytiques sur des cas gastriques

Études de précision sur les appareils BenchMark ULTRA et BenchMark XT :

La répétabilité intercycles sur l'appareil BenchMark XT a été évaluée sur cinq cycles exécutés sur une période de 5 jours (non consécutifs). Pour cinq lames comprenant trois cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+, les résultats de l'évaluation des lames étaient 100 % concordants avec le statut positif ou négatif attendu de chaque tissu.

La répétabilité intracycle sur l'appareil BenchMark XT a été évaluée sur 28 lames comprenant trois cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+. Les résultats de l'évaluation des lames pour tous les cas étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

La répétabilité intraplateforme a été évaluée sur trois appareils BenchMark XT. Dans ces cycles, pour 30 lames de chacun de deux blocs multitissus différents contenant trois cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+, les résultats de l'évaluation des lames étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

La répétabilité intraplateforme a été évaluée sur trois appareils BenchMark ULTRA. Dans ces cycles, pour 15 lames d'un bloc multitissus, les résultats de l'évaluation des lames étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

La répétabilité interplateformes a été évaluée sur trois appareils BenchMark XT et trois appareils BenchMark ULTRA. Dans ces cycles, pour 30 lames d'un bloc multitissus, les résultats de l'évaluation des lames étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

Comparaison de l'*i*VIEW DAB Detection Kit et de l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit sur des cas gastriques

La détection du clone 4B5 par l'*i*VIEW DAB Detection Kit a été comparée à la détection par l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit sur deux appareils (BenchMark XT et BenchMark ULTRA). Deux cent dix cas de tissus ont été utilisés dans le cadre de cette comparaison. Les lames colorées ont été évaluées afin de déterminer leur statut positif ou négatif.

Les taux d'acceptabilité de la morphologie et du bruit de fond étaient de 100 % pour les deux kits de détection et les deux appareils. Des comparaisons directes des résultats des évaluations cliniques (positif ou négatif) des lames colorées à l'aide des deux kits de détection sur chacun des instruments sont présentées dans les tableaux suivants.

Tableau 23. Comparaison des résultats des évaluations cliniques avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit et l'*i*VIEW DAB Detection Kit sur l'appareil BenchMark XT.

*ultra*View Universal DAB Detection Kit	*i*VIEW DAB Detection Kit		
	Positif	Négatif	Total
Positif	21	0	21
Négatif	0	189	189
Total	21	189	210
	n/N	**%**	
Taux de concordance positive	21/21	100	
Taux de concordance négative	189/189	100	
Taux de concordance globale	210/210	100	

Tableau 24. Comparaison des résultats des évaluations cliniques des lames colorées sur l'appareil BenchMark XT et l'appareil BenchMark ULTRA avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit.

Appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit	Appareil BenchMark ULTRA avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit		
	Positif	Négatif	Total
Positif	20	1	21
Négatif	0	189	189
Total	20	190	210
	n/N	**% (CI à 95 %)**	
Taux de concordance positive	20/20	100 (83.9-100)	
Taux de concordance négative	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Taux de concordance globale	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

Reproductibilité interlaboratoires du clone 4B5 sur le carcinome gastrique :

L'étude a été réalisée dans trois centres de coloration. Les échantillons ont été sélectionnés pour l'inclusion dans l'étude en fonction de leur score clinique à l'IHC réalisée avec le clone 4B5 de telle sorte qu'il y avait approximativement le même nombre de cas positifs (3+) et de cas négatifs (0, 1+). De plus, jusqu'à quatre cas de cancers gastriques qualifiés 2+ ont été étudiés.

Les trois centres ont chacun utilisé un appareil BenchMark XT et un appareil BenchMark ULTRA pour effectuer quatre cycles de coloration par instrument. Les cas ont été randomisés pour la coloration selon une procédure de randomisation stratifiée qui répartissait les cas de sorte que chaque cycle contenait des cas représentant toutes les catégories de score pour HER2 dans le cancer gastrique. Les cycles sur chacun des appareils dans chacun des centres contenaient les mêmes cas. Dans chaque centre, une lame de chaque cas a été colorée avec le clone 4B5 et une autre lame du même cas a été colorée avec le CONFIRM Negative Control Rabbit Ig sur l'appareil BenchMark ULTRA. Une deuxième paire de lames du même cas a été colorée de façon similaire sur l'appareil BenchMark XT dans chacun des centres. Les lames des cas ont été évaluées dans chaque centre par un lecteur qualifié tenu dans l'ignorance du score clinique précédemment déterminé par IHC pour chaque échantillon.

Le taux de concordance globale pour tous les cas évaluables était de 100 % pour les trois comparaisons par paire de centres tant sur l'appareil BenchMark ULTRA que sur l'appareil BenchMark XT. Le taux de concordance globale entre l'appareil BenchMark ULTRA et l'appareil BenchMark XT pour tous les cas évaluables était de 100 % à chacun des trois centres. Les taux d'acceptabilité du bruit de fond et de la morphologie de tous les cas étaient de 100 % avec les deux appareils aux centres A et C et > 95 % pour les deux appareils au centre B. Voir les tableaux ci-dessous.

Tableau 25. Taux de concordance globale entre les résultats des évaluations cliniques réalisées dans les différents centres : carcinome gastrique, tous les cas évaluables.

Appareil BenchMark ULTRA	Taux de concordance globale
Centre A vs centre B : n/N (%) (CI à 95 %)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
Centre A vs centre C : n/N (%) (CI à 95 %)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
Centre B vs centre C : n/N (%) (CI à 95 %)	30/30 (100 %) (88.6 – 100)
Appareil BenchMark XT	**Taux de concordance globale**
Centre A vs centre B : n/N (%) (CI à 95 %)	31/31 (100 %) (89.0 – 100.0)
Centre A vs centre C : n/N (%) (CI à 95 %)	31/31 (100 %) (89.0 – 100.0)
Centre B vs centre C : n/N (%) (CI à 95 %)	31/31 (100 %) (89.0 – 100.0)

Tableau 26. Taux de concordance globale entre les résultats des évaluations cliniques des cas colorés sur les deux plateformes : carcinome gastrique, tous les cas évaluables.

Appareil BenchMark ULTRA vs appareil BenchMark XT	Taux de concordance globale
Centre A : n/N (%) (CI à 95 %)	40/40 (100 %) (91.2 – 100)
Centre B : n/N (%) (CI à 95 %)	34/34 (100 %) (89.8 – 100)
Centre C : n/N (%) (CI à 95 %)	32/32 (100 %) (89.3 – 100)

Tableau 27. Taux d'acceptabilité du bruit de fond et de la morphologie : carcinome gastrique, tous les cas.

Appareil BenchMark ULTRA	Centre A	Centre B	Centre C
Taux d'acceptabilité de la morphologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Taux d'acceptabilité du bruit de fond	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
Appareil BenchMark XT	**Centre A**	**Centre B**	**Centre C**
Taux d'acceptabilité de la morphologie	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Taux d'acceptabilité du bruit de fond	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

Étude de comparaison de l'appareil BenchMark et de l'appareil BenchMark GX par rapport à l'appareil BenchMark XT : carcinome gastrique

Des lames de trois puces tissulaires (TMA) comprenant des cas de carcinomes gastriques FFPE [environ 50 cas par TMA] ont été colorées sur un appareil BenchMark XT, un appareil BenchMark et un appareil BenchMark GX à l'aide des protocoles de coloration respectifs pour l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit et l'*i*VIEW DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient les PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides et une deuxième lame de chaque TMA colorée avec une Ig de contrôle négatif. Les lames colorées ont été évaluées par un lecteur (anatomopathologiste).

Les taux de concordance globale (et la limite inférieure des intervalles de confiance à 95 %) pour la coloration avec l'anticorps monoclonal 4B5 déduits des résultats des évaluations cliniques (positif, négatif) étaient comme suit : 98.0 % (94.2-99.3) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 97.4 % (93.6-99.0) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 96.6 % (92.7-98.4) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit et 95.9 % (91.8-98.0) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit.

Les taux de concordance positive (et la limite inférieure des intervalles de confiance à 95 %) pour la coloration avec l'anticorps monoclonal 4B5 déduits des résultats des évaluations cliniques (positif, négatif) étaient comme suit : 91.7 % (64.4-98.5) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 78.6 % (52.4-92.4) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 80.0 % (54.8-93.0) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit et 73.3 % (48.0-89.1) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit.

Les taux de concordance négative (et la limite inférieure des intervalles de confiance à 95 %) pour la coloration avec l'anticorps monoclonal 4B5 déduits des résultats des évaluations cliniques (positif, négatif) étaient comme suit : 98.5 % (94.8-99.6) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 99.3 % (96.1-99.9) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, 98.1 % (94.6-99.4) entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit et 98.1 % (94.5-99.3) entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit. Les représentations 2 × 2 des taux de concordance pour chaque comparaison basés sur les résultats des évaluations cliniques (positif, négatif) se trouvent dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 28. Taux de concordance interplateformes entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, analyse 2 x 2 : carcinome gastrique.

Clone 4B5 avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
	Appareil BenchMark XT		
Appareil BenchMark	Positif	Négatif	Total
Positif	11	2	13
Négatif	1	133	134
Total	12	135	147
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance globale	144/147	98.0 % (94.2-99.3)	
Taux de concordance positive	11/12	91.7 % (64.6-98.5)	
Taux de concordance négative	133/135	98.5 % (94.8-99.6)	

Tableau 29. Taux de concordance interplateformes entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit, analyse 2 x 2 : carcinome gastrique.

Clone 4B5 avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
	Appareil BenchMark XT		
Appareil BenchMark GX	Positif	Négatif	Total
Positif	11	1	12
Négatif	3	140	143
Total	14	141	155
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance globale	151/155	97.4 % (93.6-99.0)	
Taux de concordance positive	11/14	78.6 % (52.4-92.4)	

Clone 4B5 avec l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit			
	Appareil BenchMark XT		
Appareil BenchMark GX	Positif	Négatif	Total
Taux de concordance négative	140/141	99.3 % (96.1-99.9)	

Tableau 30. Taux de concordance interplateformes entre l'appareil BenchMark et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit, analyse 2 x 2 : carcinome gastrique.

Clone 4B5 avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit			
	Appareil BenchMark XT		
Appareil BenchMark	Positif	Négatif	Total
Positif	12	3	15
Négatif	3	156	159
Total	15	159	174
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance globale	168/174	96.6 % (92.7-98.4)	
Taux de concordance positive	12/15	80.0 % (54.8-93.0)	
Taux de concordance négative	156/159	98.1 % (94.6-99.4)	

Tableau 31. Taux de concordance interplateformes entre l'appareil BenchMark GX et l'appareil BenchMark XT avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit, analyse 2 x 2 : carcinome gastrique.

Clone 4B5 avec l'*i*VIEW DAB Detection Kit			
	Appareil BenchMark XT		
Appareil BenchMark GX	Positif	Négatif	Total
Positif	11	3	14
Négatif	4	154	158
Total	15	157	172
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance globale	165/172	95.9 % (91.8-98.0)	
Taux de concordance positive	11/15	73.3 % (48.0-89.1)	
Taux de concordance négative	154/157	98.1 % (94.5-99.3)	

Études de précision sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS

La répétabilité intracycle sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS a été évaluée sur 120 lames de 24 cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+. Les résultats de l'évaluation des lames pour tous les cas étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

Pour la répétabilité intercycles sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS, les colorations ont été réalisées en cinq cycles sur une période de 5 jours (non consécutifs), ce qui a donné 240 lames colorées de 24 cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+. Les résultats de l'évaluation des lames pour tous les cas étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

La répétabilité intraplateforme a été évaluée sur trois appareils BenchMark ULTRA PLUS. Ces cycles ont donné 144 lames colorées de 24 cas de tissus gastriques avec des scores d'expression de HER2 de 0, 1+, 2+ et 3+. Les résultats de l'évaluation des lames pour tous les cas étaient concordants avec le score positif ou négatif attendu de chaque type de tissu.

Concordance entre les résultats de l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et de l'appareil BenchMark ULTRA

Des lames de 94 cas de carcinomes gastriques FFPE ont été colorées sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS et un appareil BenchMark ULTRA à l'aide des protocoles de coloration recommandés respectifs pour l'*ultra*View Universal DAB Detection Kit. Les contrôles comprenaient un cas de carcinome gastrique HER2 positif inclus à chaque cycle de coloration et une deuxième lame de chaque cas à tester colorée avec une Ig de contrôle négatif. Les lames colorées ont été évaluées par un lecteur (anatomopathologiste).

Le taux de concordance globale entre les statuts (positif, négatif) déduits des lames colorées avec l'anticorps anti-HER2 (4B5) sur les deux appareils était de 98.9 %. Les taux de concordance positive et négative étaient de, respectivement, 100.0 et 98.4 %. Les intervalles de confiance bilatéraux à 95 % ont été calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson. Les taux d'acceptabilité du bruit de fond et de la morphologie de tous les cas étaient de 100 % avec les deux appareils.

PERFORMANCES CLINIQUES

Études de comparaison de l'anticorps monoclonal de lapin 4B5 et du PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody sur le cancer du sein

Une étude de comparaison de méthodes a été menée pour examiner la corrélation entre les résultats obtenus avec le clone 4B5 et ceux obtenus avec le PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)) et le PathVysion HER2 FISH, deux tests diagnostiques déjà autorisés par la FDA. Six investigateurs ont participé à l'étude. Deux groupes de trois investigateurs différents ont évalué deux cohortes indépendantes (cohorte 1 : n = 178, cohorte 2 : n = 144) de cas connus de cancer du sein colorés à l'aide de l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) et du clone 4B5. Les données du test FISH ont été obtenues à partir des antécédents des patients. Un score consensuel des trois lecteurs pour chaque anticorps a été créé pour chaque cas afin de réduire la variabilité intralecteur inhérente à la détermination du score HER2.[34,35,36] Évaluation. Un total de 322 cas ont été évalués. Les lames colorées à l'aide de l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) ont été traitées et colorées conformément aux instructions du fabricant indiquées dans la fiche technique de l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11). En moyenne, il s'est écoulé environ un an entre la coloration et la lecture des lames colorées à l'aide de l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11). Les scores de l'un des six lecteurs étant en dehors de l'intervalle de confiance (CI), les données des deux cohortes sont présentées comme suit :

Reproductibilité interanatomopathologistes des résultats des échantillons des études de comparaison

Tableau 32. Cohorte 1 : scores d'IHC consensuels des trois anatomopathologistes.

Score avec le clone 4B5	Score avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Total	31	37	75	143

Cohorte 1 : caractéristiques de performances pour la représentation 3 × 3.

Le taux de concordance globale est de (29+13+53)/143 = 66.4 % (CI à 95 % = 38.6-59.7 %).

Cohorte 1 : caractéristiques de performances pour la représentation 2 × 2 (les scores immunohistochimiques HER-2 positifs (2+ et 3+) et négatifs (0+ et 1+) sont combinés).

- Le taux de concordance positive est de (29+2+24+13)/(31+37) = 100 % (CI à 95 % = 97.5 %-100 %).
- Le taux de concordance négative est de 53/75 = 70.7 % (CI à 95 % = 58.5 %-80.1 %).

Le taux de concordance globale est de (29 +24+2+13+53)/143 = 84.7 % (CI à 95 % = 78.2%-90.0 %).

Tableau 33. Cohorte 2 : scores d'IHC consensuels des trois anatomopathologistes.

Score avec le clone 4B5	Score avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Total	73	20	85	178

Cohorte 2 : caractéristiques de performances pour la représentation 3 × 3.

Le taux de concordance globale est de (72+12+80)/178 = 92.1 % (CI à 95 % = 80.1 %-93.1 %).

Cohorte 2 : caractéristiques de performances pour la représentation 2 × 2 (les scores immunohistochimiques HER2 positifs (2+ et 3+) et négatifs (0+ et 1+) sont combinés).

- Le taux de concordance positive est de (72+12+1+1)/(73+20) = 92.5 % (CI à 95 % = 85.2 %-96.9 %).
- Le taux de concordance négative est de 80/85 = 94.1% (CI à 95 % = 86.8 %-98.1 %).

Le taux de concordance globale est de (72+12+1+1+80)/178 = 93.3 % (CI à 95 % = 88.5 %-96.4 %).

Tableau 34. Cohorte 1 : scores d'IHC consensuels avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) des trois anatomopathologistes comparés aux résultats du test FISH.

Score avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)	Résultat de la FISH		
	Positif	Négatif	Total
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Total	86	58	144

Cohorte 1 : caractéristiques de performances de l'IHC avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) et du test FISH, représentation 2 × 2 (pour laquelle les scores de 2 et 3 sont considérés comme positifs).

- Le taux de concordance positive est de (32+32)/86 = 74.4 % (CI à 95 % = 63.8 %-83.2 %).
- Le taux de concordance négative est de 53/58 = 91.4 % (CI à 95 % = 80.9 %-97.1 %).

Le taux de concordance globale est de (32+32+53)/144 = 81.2 % (CI à 95 % = 73.9 %-87.2 %).

Tableau 35. Cohorte 1 : scores d'IHC consensuels avec le clone 4B5 des trois anatomopathologistes comparés aux résultats du test FISH.

Score avec le clone 4B5	Résultat de la FISH		
	Positif	Négatif	Total
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Total	86	58	144

Cohorte 1 : caractéristiques de performances du clone 4B5 et du test FISH, représentation 2 × 2 (pour laquelle les scores de 2 et 3 sont considérés comme positifs).

- Le taux de concordance positive est de (55+25)/86 = 93.0 % (CI à 95 % = 87.9 %-96.3 %).
- Le taux de concordance négative est de 47/58 = 81.0 % (CI à 95 % = 73.4 %-86.0 %).

Le taux de concordance globale est de (55+25+47)/144 = 88.2 % (CI à 95 % = 82.1 %-92.2 %).

Tableau 36. Cohorte 2 : scores d'IHC consensuels avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) des trois anatomopathologistes comparés aux résultats du test FISH.

Score avec l'anticorps PATHWAY HER2 (CB11)	Résultat de la FISH		
	Positif	Négatif	Total
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Total	93	85	178

Cohorte 2 : caractéristiques de performances de l'IHC avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) et du test FISH, représentation 2 × 2 (pour laquelle les scores de 2 et 3 sont considérés comme positifs).

- Le taux de concordance positive est de (72+13)/93 = 91.3 % (CI à 95 % = 85.0 %-96.7 %).
- Le taux de concordance négative est de 77/85 = 90.6 % (CI à 95 % = 83.9 %-96.3 %).

Le taux de concordance globale est de (72+13+77)/178 = 91.0 % (CI à 95 % = 86.5 %-94.9 %).

Tableau 37. Cohorte 2 : scores d'IHC consensuels avec le clone 4B5 des trois anatomopathologistes comparés aux résultats du test FISH.

Score avec le clone 4B5	Résultat de la FISH		
	Positif	Négatif	Total
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Total	93	85	178

Cohorte 2 : caractéristiques de performances du clone 4B5 et du test FISH, représentation 2 × 2 (pour laquelle les scores de 2 et 3 sont considérés comme positifs).

- Le taux de concordance positive est de (72+11)/93 = 89.2 % (CI à 95 % = 82.5 %-95.1 %).
- Le taux de concordance négative est de 77/85 = 90.6 % (CI à 95 % = 84.0 %-96.4 %).

Le taux de concordance globale est de (72+11+77)/178 = 90.0 % (CI à 95 % = 85.4 %-93.6 %).

Reproductibilité interanatomopathologistes des résultats des échantillons des études de comparaison

Comme il est avéré que différents anatomopathologistes peuvent interpréter différemment des lames d'immunohistochimie, on a fait appel à trois anatomopathologistes pour chacune des deux cohortes (soit un total de six anatomopathologistes) pour évaluer tous les échantillons. Une règle des deux sur trois a été utilisée pour décider des résultats finaux. Les différents résultats obtenus pour chaque cohorte par les trois anatomopathologistes avec les échantillons de l'étude de comparaison sont résumés ci-dessous.

Tableau 38. Cohorte 1 : scores attribués par les trois anatomopathologistes avec le clone 4B5.

	Score avec le clone 4B5		
Score HER2	Investigateur 1	Investigateur 2	Investigateur 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Total	174	178	178

Remarque : Au total, trois échantillons se sont vu attribuer par les trois anatomopathologistes des scores qui différaient de plus d'un degré (à savoir 0, 2+).

Échantillon 1 : un anatomopathologiste a attribué un score de 2+, et deux anatomopathologistes ont attribué un score de 0.

Échantillon 2 : un anatomopathologiste a attribué un score de 0, et deux anatomopathologistes ont attribué un score de 2+.

Échantillon 3 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 1+ et le troisième un score de 2+.

Tableau 39. Cohorte 1 : scores d'IHC attribués par les trois anatomopathologistes avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11).

	Score avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
Score HER2	Investigateur 1	Investigateur 2	Investigateur 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Total	174	178	178

Remarque : Au total, un échantillon s'est vu attribuer par les trois anatomopathologistes des scores qui différaient de plus d'un degré (à savoir 1-3+).

Échantillon 1 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 1+, le deuxième un score de 2+ et le troisième un score de 3+.

Tableau 40. Cohorte 2 : scores attribués par les trois anatomopathologistes avec le clone 4B5.

	Score avec le clone 4B5		
Score HER2	Investigateur 4	Investigateur 5	Investigateur 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Total	141	144	144

Remarque : Au total, six échantillons se sont vu attribuer par les trois anatomopathologistes des scores qui différaient de plus d'un degré (à savoir 0, 3+).

Échantillon 1 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 0 et le troisième un score de 2+.

Échantillon 2 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 1+, le deuxième un score de 1+ et le troisième un score de 3+.

Échantillon 3 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 2+ et le troisième un score de 2+.

Échantillon 4 et 5 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 2+ et le troisième un score de 2+.

Échantillon 6 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 3+ et le troisième un score de 3+.

Tableau 41. Cohorte 2 : scores d'IHC attribués par les trois anatomopathologistes avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11).

	Score avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
Score HER2	Investigateur 4	Investigateur 5	Investigateur 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Total	144	144	144

Remarque : Au total, huit échantillons se sont vu attribuer par les trois anatomopathologistes des scores qui différaient de plus d'un degré (à savoir 0-2+).

Échantillon 1 à 6 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 1+ et le troisième un score de 2+.

Échantillon 7 et 8 : le premier anatomopathologiste a attribué un score de 0, le deuxième un score de 2+ et le troisième un score de 2+.

Les plages des taux de concordance entre les paires d'anatomopathologistes (trois paires pour chaque cohorte) sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 42. Plages des taux de concordance 2 × 2 * pour les trois anatomopathologistes.

	Taux de concordance globale	Taux de concordance positive	Taux de concordance négative
Clone 4B5 vs anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11)			
Cohorte 1	82.6–86.9 %	97.3–100.0 %	68.0–75.4 %
Cohorte 2	88.2–95.5 %	87.6–95.6 %	86.1–95.4 %
Clone 4B5 vs test FISH			
Cohorte 1	86.8–88.2 %	90.7–94.2 %	79.3–81.0 %
Cohorte 2	87.4–89.9 %	88.2–90.0 %	84.5–91.8 %
Anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11) vs FISH			
Cohorte 1	79.9–84.0 %	73.3–80.2 %	89.7–89.7 %
Cohorte 2	84.8–93.3 %	86.7–92.5 %	82.7–94.1 %

* 0, 1+ = négatif. 2+ et 3+ = positif.

Conclusion : cette étude démontre qu'il y a une concordance cliniquement significative (concordance globale entre les résultats positifs et entre les résultats négatifs) entre le test réalisé avec le clone 4B5 et le test réalisé avec l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (CB11), ce qui indique que le clone 4B5 HER2 est un anticorps de substitution à l'anticorps CB11 acceptable pour une utilisation en tant qu'aide à l'évaluation des patientes atteintes d'un cancer du sein pour lesquelles un traitement par trastuzumab (Herceptin) est envisagé. Cette étude montre que les résultats quant à l'expression de HER2 obtenus avec le test d'IHC réalisé avec le clone 4B5 sont comparables aux statuts du gène *HER2* déterminés par analyse par FISH.

Comparaison du clone 4B5 et de l'HercepTest sur le cancer de l'estomac humain :

Une étude externe a été réalisée en aveugle pour comparer les performances de la coloration à l'aide du clone 4B5 sur l'appareil BenchMark XT à celles du Dako HercepTest. Deux cohortes d'échantillons ont été étudiées : (1) des puces tissulaires (TMA) nouvellement préparées contenant 248 cas de cancer de l'estomac (six cas, dont il a été constaté ultérieurement qu'ils étaient dupliqués, ont été exclus), et (2) un sous-ensemble de 183 échantillons de l'essai clinique intitulé Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) qui a consisté à étudier le statut HER2 et le résultat clinique chez des patients traités par Herceptin (trastuzumab). Le laboratoire a coloré les cas avec le clone 4B5 et

l'HercepTest. Un total de 431 cas étaient évaluables par les deux tests et ont été inclus à la comparaison. Un anatomopathologiste a attribué un score aux cas sur une échelle de 0/1+, 2+ et 3+. Les cas positifs correspondent aux scores de 2+ et 3+, alors que les cas négatifs ont des scores de 0 et 1+. Les taux de concordance entre le clone 4B5 et l'HercepTest pour les deux cohortes étudiées se trouvent dans le Tableau 43.

Tableau 43. Données de concordance entre le clone 4B5 (IHC) et l'HercepTest sur le carcinome gastrique.

Source des tissus	Taux de concordance globale (CI à 95 %)	Taux de concordance positive (CI à 95 %)	Taux de concordance négative (CI à 95 %)
TMA[a] et 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

Les résultats de l'IHC étaient considérés comme étant positifs à l'anticorps (2+ et 3+) et négatifs (0+ et 1+).

[a] TMA :échantillons de puce tissulaire

[b] ToGA : échantillons de l'essai clinique ToGA

Comparaison des méthodes des tests de recrutement des études sur le PERJETA (pertuzumab) et le KADCYLA (trastuzumab emtansine) dans le carcinome du sein

L'équivalence entre les tests de recrutement des cohortes des études sur le PERJETA et le KADCYLA a été déterminée par coloration des échantillons de ces essais avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). 2753 échantillons évalués pour un essai du PERJETA et 99 échantillons évalués pour un essai du KADCYLA ont été colorés avec l'anticorps VENTANA anti-HER2 (4B5). Les taux de concordance (PPA, NPA et OPA) ont été déterminés. L'intervalle de confiance (CI) à 95 % bilatéral a été calculé par la méthode du score.

Tableau 44. Concordance entre les statuts HER2 déterminés à l'aide du test réalisé avec le clone 4B5 et du test Dako de tous les sujets évaluables pour HER2. Les sujets évaluables par IHC ont un statut HER2 positif ou négatif déterminé à la fois à l'aide du clone 4B5 et du test d'IHC de recrutement des essais.

		Statut HER2 avec Dako [a,b]		
Étude	Score avec le clone 4B5 [b]	Positif	Négatif	Total
PERJETA et KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Total	2558	272	2830
	Taux de concordance positive n/N (%) (CI à 95 %)	2380/2558 (93.0) (92.0-94.0)		
	Taux de concordance négative n/N (%) (CI à 95 %)	257/272 (94.5) (91.1-96.6)		
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 95 %)	2637/2830 (93.2) (92.2-94.1)		

[a] Positif = positif à l'IHC et/ou amplifié à l'ISH. Négatif = négatif à l'IHC et non amplifié à l'ISH ou non amplifié à l'ISH et non positif à l'IHC.

[b] IHC : positif = 3+ ; négatif = 0, 1+ ou 2+.

Tableau 45. Concordance entre les statuts IHC déterminés à l'aide du test réalisé avec le clone 4B5 et du test Dako de tous les sujets évaluables par IHC. Les sujets évaluables par IHC ont un statut HER2 positif ou négatif déterminé à la fois à l'aide du clone 4B5 et du test d'IHC de recrutement des essais.

		Statut avec le Dako HercepTest [a]		
Étude	Statut avec le clone 4B5 [a]	Positif	Négatif	Total
PERJETA et KADCYLA	Positif	2330	65	2395
	Négatif	21	414	435
	Total	2351	479	2830
	Taux de concordance positive n/N (%) (CI à 95 %)	2330/2351 (99.1) (98.6-99.4)		
	Taux de concordance négative n/N (%) (CI à 95 %)	414/479 (86.4) (83.1-89.2)		
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 95 %)	2744/2830 (97.0) (96.3-97.5)		
PERJETA	Positif	2267	63	2330
	Négatif	10	399	409
	Total	2277	462	2739
	Taux de concordance positive n/N (%) (CI à 95 %)	2267/2277 (99.6) (99.2-99.8)		
	Taux de concordance négative n/N (%) (CI à 95 %)	399/462 (86.4) (82.9-89.2)		
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 95 %)	2666/2739 (97.3) (96.7-97.9)		
KADCYLA	Positif	63	2	65
	Négatif	11	15	26
	Total	74	17	91
	Taux de concordance positive n/N (%) (CI à 95 %)	63/74 (85.1) (75.3-91.5)		
	Taux de concordance négative n/N (%) (CI à 95 %)	15/17 (88.2) (65.7-96.7)		
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 95 %)	78/91 (85.7) (77.1-91.5)		

[a] Positif = 3+ ; négatif = 0, 1+ ou 2+.

Tableau 46. Concordance entre les score d'IHC déterminés à l'aide du test réalisé avec le clone 4B5 et du test Dako de tous les sujets évaluables par IHC. Les sujets évaluables par IHC ont un statut HER2 positif ou négatif déterminé à la fois à l'aide du clone 4B5 et du test d'IHC de recrutement des essais.

		Score avec le Dako HercepTest			
Étude	**Score avec le clone 4B5**	**3+**	**2+**	**0/1+**	**Total**
PERJETA et KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Total	2351	325	154	2830
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 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
	Total	2277	312	150	2739
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 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
	Total	74	13	4	91
	Taux de concordance globale n/N (%) (CI à 95 %)	74/91 (81.3) (72.1-88.0)			

Tableau 47. Acceptabilité de la coloration avec le clone 4B5. Sujets testés par IHC. La coloration par IHC est considérée comme acceptable si un score IHC valide (0, 1+, 2+ ou 3+) pouvait être déterminé. Les raisons d'une coloration inacceptable comprennent un contrôle négatif inacceptable, une perte de tissu, une surface tumorale insuffisante, un bruit de fond inacceptable et une morphologie inacceptable.

Paramètre	**PERJETA**	**KADCYLA**	**PERJETA et KADCYLA**
Nombre de tests IHC initiaux	2753	99	2852
Taux d'acceptabilité de la coloration initial n/N (%) (CI à 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)
Nombre de tests IHC répétés	40	0	40
Taux d'acceptabilité de la coloration final n/N (%) (CI à 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)

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1. Si le contrôle positif présente une coloration plus faible qu'attendue, vérifier les autres contrôles positifs colorés simultanément au cours du même cycle pour déterminer si cela est dû à l'anticorps primaire ou à l'un des réactifs secondaires communs.
2. Si le contrôle positif est négatif, vérifier que la lame porte la bonne étiquette code-barres. Si l'étiquette de la lame est correcte, vérifier les autres contrôles positifs colorés simultanément durant le même cycle pour déterminer si cela est dû à l'anticorps primaire ou à l'un des réactifs secondaires communs. Les tissus n'ont peut-être pas été correctement prélevés, fixés ou déparaffinés. Suivre les procédures appropriées de prélèvement, conservation et fixation.
3. Si l'élimination de la paraffine est incomplète, cela peut entraîner une absence de coloration. La procédure de déparaffinage doit être répétée.
4. Si la coloration spécifique à l'aide de l'anticorps est trop intense, répéter le cycle en réduisant progressivement le temps d'incubation jusqu'à ce que l'intensité souhaitée soit atteinte.
5. Si les coupes de tissus se détachent des lames, vérifier que les lames sont positivement chargées.
6. Si une coloration cytoplasmique et une coloration nucléaire sont présentes dans la muqueuse normale à proximité immédiate de la zone tumorale du carcinome gastrique et peuvent être confondues avec la coloration de la membrane et gêner l'interprétation, le cas peut être testé par ISH.
7. Pour les mesures correctives, consulter la rubrique Procédure de coloration, le guide d'utilisation de l'appareil ou contacter le représentant du service client local.

REFERENCES

1. Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
3. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
4. Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egfr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016;35(4):575-588.
5. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
6. Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
7. Hudis CA. Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.
8. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.
9. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376: 687-697.
10. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. Gastrointest Endosc. 2019;90(1):44-54.
11. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Ann Oncol. 2016;27(suppl 5):v38-v49.

12. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. Gastric Cancer. 2015;18(3):476-484.
13. Herceptin (Trastuzamab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
14. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. Mayo Clin Proc. 1994;69: 57-58.
15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses Her2. N Engl J Med. 2001;344(11):783-792.
16. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.
17. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
18. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2019;380(7):617-628.
19. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(8):1154-1161.
20. Cislo M, Filip AA, Arnold Offerhaus GJ, et al. Distinct Molecular Subtypes of Gastric Cancer: From Lauren to Molecular Pathology. Oncotarget. 2018;9(27):19427-19442.
21. DePotter CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. Histopathology. 1989;15:351-362.
22. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
23. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
24. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
25. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
26. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
27. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
28. CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
29. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008:52;797-805.
30. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
31. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
32. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
33. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
34. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent *in situ* hybridization, Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
35. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
36. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

REMARQUE : Dans ce document, le point est toujours utilisé comme séparateur décimal pour indiquer la séparation entre la partie entière et la partie décimale des nombres décimaux. Aucun séparateur de milliers n’est utilisé.

Le résumé des résultats sur la sécurité et les performances est disponible ici :

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

Symboles

Ventana utilise les symboles et les signes suivants en plus de ceux indiqués dans la norme ISO 15223-1 (pour les États-Unis, voir dialog.roche.com pour la définition des symboles utilisés) :

GTIN	Code article international
UDI	Identifiant unique des dispositifs médicaux
	Indique l’entité important le dispositif médical dans l’Union européenne

HISTORIQUE DES REVISIONS

Rév.	Mises à jour
D	Mise à jour des rubriques suivantes : Utilisation prévue, Résumé et explication, Signification clinique, Principe de la procédure, Matériel fourni, Matériel nécessaire mais non fourni, Préparation des échantillons, Avertissements et précautions d’emploi, Procédures de contrôle qualité, Tissu de contrôle positif, Interprétation de la coloration/résultats attendus, Performances analytiques, Références. Addition de l’appareil BenchMark ULTRA PLUS.

PROPRIETE INTELLECTUELLE

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultra*View et le logo VENTANA sont des marques commerciales de Roche. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

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

COORDONNEES

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

www.roche.com

CE