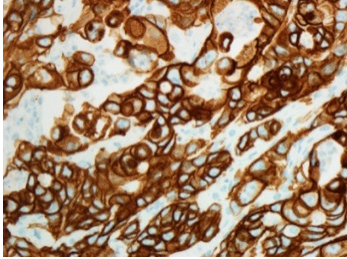


VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493

05999570001

IVD  50



Şekil 1. VENTANA gastrik karsinomda anti-HER2/neu (4B5) 3+ boyama.

KULLANIM AMACI

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)), VENTANA otomatik IHC/ISH slayt boyama cihazında formalinle fikse edilip parafine gömülmüş normal ve neoplastik meme dokusu ve gastrik doku kesitlerinde HER2 antijeninin yarı kantitatif olarak saptanmasında kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Herceptin tedavisinin düşünüldüğü meme kanseri ve gastrik kanser

hastalarının değerlendirilmesinde ve Kadcylla (trastuzumab emtansin) veya Perjeta (pertuzumab) tedavileri için meme kanseri hastalarının değerlendirilmesinde yardımcı bir araç olarak endike edilmektedir.

Bu ürün uzman bir patolog tarafından, histolojik inceleme, ilgili klinik bilgiler ve doğru kontrollerle birlikte değerlendirilmelidir.

Bu antikor *in vitro* tanı amaçlı kullanıma yöneliktir.

ÖZET VE AÇIKLAMA

VENTANA HER2 (4B5) bir tavşan monoklonal antikordur (clone 4B5) ve cerbB2 onkoprotein (HER2) internal domain'ine karşı yönlendirilmiştir. c-erbB-2 onkoprotein Akiyama et al tarafından 1986 yılında klonlanmış ve karakterize edilmiştir.¹ Yapısal olarak epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) benzeyen yaklaşık 185 kD transmembran glikoproteindir. Protein, birçok büyüme faktörü reseptöründe ve src ailesinin dönüştürücü proteinlerinde görülene benzer bir tirozin kinaz etkinliği ile ilişkilendirilmektedir. Kodlama dizisi, ekstrasellüler bağlanma alanı ve intrasellüler kinaz alanı ile tutarlıdır. Bu durum, HER2'nin sinyal iletiminde ve mitojenik etkinlik stimülasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir.¹

Clone 4B5'in, SK-BR-3 hücre lizatından bir 185 kD protein ile reaksiyona girdiği Western blotting yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. SK-BR-3, HER2 mRNA'nın 128 kat aşırı ekspresyonuna sahip bir meme karsinomu hücre dizisidir.² Tespit edilen bandın boyutu, HER2 proteini (185 kD) için rapor edilenle iyi korele edilmektedir.¹ Transfekte edilmiş hücre dizileriyle (HEK293) yapılan immünohistokimya deneyleri, clone 4B5'in HER2 ile transfekte edilmiş hücreleri ve HER4 ile transfekte edilmiş hücreleri boyadığını göstermiştir. HER1 veya HER3 ile transfekte edilmiş hücrelerin boyanmadığı gözlemlenmiştir. Rekombinant HER4 proteini ile elde edilen Western blot verileri ayrıca, Clone 4B5'in bir HER4 epitopunu tanıdığını göstermiştir.

Meme karsinomunda HER2 proteini, değişik bölgelerden alınan adenokarsinomların %20'sine varan bir oranında immünohistokimya ile saptanabilen bir düzeyde eksprese edilir. İnvazif duktal karsinomların %15 ile %30 arası bir oranı HER2 açısından pozitifdir.³ Meme Paget hastalığı vakalarının neredeyse tümü⁴ ve komedo tipinde *in situ* duktal karsinom vakalarının %90'a varan bir oranı pozitifdir.³ Gastrik karsinomda HER2 proteini, gastrik kanserlerin intestinal tipinde %30'a, karma tipinde %15'e ve yaygın tipinde %5'e varan oranlarda immünohistokimya ile saptanabilen bir düzeyde eksprese edilir. HER2 proteini aşırı ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak saptanması ayrıca, HER2'yi hedefleyen tedavinin endike olduğu hastaların belirlenmesinde de yardımcı olarak kullanılmaktadır.^{5,31-35}

Normal dokularda, neoplastik dokularda ve Clone 4B5'i içeren 322 meme karsinomu vakasında boyama sonuçları Ventana tarafından değerlendirilmiştir. Test edilen normal dokularda, ekspresyon, aşağıdaki istisnalar hariç olmak kaydıyla, beklenmedik spesifik sitoplazmik/membran boyama olmaması yönünden yayımlanan literatürle tutarlıydı: epitelyal hücre membranı boyaması gösteren iki tonsil vakası, bir paratiroid vakası ve bir özofageal epitel vakası. Test edilen neoplastik dokulardan, meme, kolon ve over kanser hücrelerinde sitoplazmik/membran boyama görülmüştür. Üç yüz yirmi iki (322) meme

karsinomu, PATHWAY HER-2/neu (CB11) ile karşılaştırmalı bir yöntem kullanılarak Clone 4B5 ile değerlendirilmiştir. Bu iki test arasında anlamlı bir boyama korelasyonu bulunmamaktadır. Daha fazla bilgi için Beklenen Sonuçların Özeti bölümüne bakın. Clone 4B5 hakkında daha fazla bilgi ise Referanslar bölümünde bulunabilir.²⁴⁻³⁰

Önceden seyreltilmiş VENTANA HER2 (4B5) ile kullanıma hazır *VIEW* DAB Detection Kit ve *ultraView* Universal DAB Detection Kit'in bir VENTANA otomatik IHC/ISH slayt boyama cihazı ile kombine olarak kullanılması, bireysel reaktif seyreltme, manuel pipetleme ve manuel reaktif uygulamasından kaynaklanan insan hatası olasılığını ve yapısal değişkenliği azaltır.

KLİNİK ÖNEMİ

Meme kanseri kadınlarda meydana gelen en yaygın kanser türüdür ve ikinci en yaygın kanserle ilişkili ölüm nedenidir. Kuzey Amerika'da, bir kadının meme kanserine yakalanma olasılığı sekizde birdir.⁶ Erken saptama ve doğru tedavi terapileri genel sağkalımı önemli ölçüde etkileyebilir.⁷ Gastrik kanser en yaygın dördüncü kanser türüdür ve dünya çapında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. Mide kanseri için en yaygın tedavi cerrahidir. Ancak, çoğu gastrik kanser vakası ilerlemiş bir aşamada teşhis edilmekte ve çoğu zaman cerrahinin yapılması güç olmaktadır. Kanser hastalarının sağkalım oranı çok düşük olsa bile ilerlemiş gastrik kanserin tedavisi için kemoterapi kullanılmaktadır. Küçük doku örneklerinin rutin immünohistokimya (IHC) kolaylıkla kullanılabilir olması, bu tekniği, karsinomun yorumlanması açısından önemli antijenleri saptayan antikorlarla kombine olarak kullanıldığında patolojik için hastalık tanısında ve prognozunda etkili bir araç kılmaktadır. Günümüzde meme kanserinde ve gastrik kanserde önemli bir işaret c-erbB-2 onkoproteinidir (HER2).

HER2 bir transmembran proteindir.⁸ EGFR ile yakından ilgilidir ve EGFR gibi, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir.¹ Meme ve gastrik karsinomlar dahil çeşitli tümörlerde gen amplifikasyonu ve buna karşılık gelen c-erbB-2 aşırı ekspresyonu bulunmuştur.^{8,9}

HER2'nin hedeflendiği tedavilerin bazı meme karsinomu ve gastrik karsinom hastalarına fayda sağladığı kanıtlanmıştır. HER2'nin hedeflendiği tedaviden yalnızca HER2 pozitif meme ve gastrik karsinomu olan hastalar yararlanmalıdır. Meme karsinomunda ve gastrik karsinomda HER2 durumunun belirlenmesine yönelik *in vitro* tanımlar, HER2'nin hedeflendiği tedaviler için uygun olan hastalara karar vermesinde klinisyene yardımcı olması itibarıyla önemlidir.

HER2 için her türlü belirleme sistemi sonuçlarının yorumlanması esnasında HER2'nin her ne kadar farklı seviye ve farklı paternlerde olsa da hem meme kanseri ve gastrik kanser tümörlerinde hem de sağlıklı dokuda görüldüğü göz önünde tutulmalıdır.¹⁰ Histolojik doku hazırlığının sağlam doku morfolojisi avantajı vardır ve bu durum numunenin HER2 pozitifliğini yorumlamada yardımcıdır.

PROSEDÜRÜN İLKELERİ

VENTANA HER2 (4B5), parafine gömülmüş doku kesitlerinde HER2'ye bağlanan bir tavşan monoklonal antikordur. Spesifik antikor, tavşan immünooglobulinlerini tanıyan biyotin konjugatlı bir sekonder antikor formülasyonu uygulanıp ardından streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı (*VIEW* DAB Detection Kit) ya da bir sekonder antikor-HRP konjugatı (*ultraView* Universal DAB Detection Kit) eklenerek lokalize edilebilir. Bu sayede, spesifik antikor-enzim kompleksi, çökelen bir enzim reaksiyon ürünüyle görüntülenir. Her bir adım, belirli bir sıcaklıkta ve kesin bir süre boyunca inkübe edilir. Her inkübasyon adımının sonunda, VENTANA otomatik IHC/ISH slayt boyama cihazı reaksiyonu durdurmak ve müteakip adımlarda istenilen reaksiyonun elde edilmesini önleyebilecek bağlı olmayan materyali temizlemek amacıyla kesitleri yıkar. Aynı zamanda sulu reaktiflerin numune slayttan buharlaşmasını minimize etmek için Liquid Coverslip uygulanır.

Klinik vakalar ilgili kontrollerin gerçekleştirilmesi bağlamında değerlendirilmelidir.

Ventana, hasta numunesiyle (örneğin, zayıf bir şekilde pozitif meme karsinomu veya gastrik karsinom gibi) aynı biçimde fikse edilmiş ve işlenmiş bir pozitif doku kontrolünün dahil edilmesini tavsiye etmektedir. (VENTANA) HER2 (4B5) ile boyamaya ek olarak, ikinci bir slayt CONFIRM Negative Control Rabbit Ig ile boyanmalıdır. Testin geçerli kabul edilmesi için, pozitif kontrol dokusunun tümör hücrelerinde membran boyama göstermesi gerekir. Bu bileşenler CONFIRM Negative Control Rabbit Ig ile boyandığında negatif olmalıdır. Ayrıca, VENTANA otomatik IHC/ISH slayt boyama cihazında işlemi yapılan ve yürütülen her numune serisi için negatif bir doku kontrol slaydına (örneğin, HER2 negatif meme karsinomu veya gastrik karsinom) yer verilmesi önerilir. Antijen güçlendirme ve diğer ön işlem prosedürlerinin yanlış pozitif boyamaya neden olmadığından emin olmak için bu negatif doku kontrolü VENTANA HER2 (4B5) ile boyanmalıdır.

ÜRÜNLERLE BİRLİKTE VERİLEN REAKTİFLER

VENTANA HER2 (4B5) dispenseri 50 test için yeterli reaktif içerir.

Bir adet 5 mL'lik VENTANA HER2 (4B5) dispenseri insan c-erbB-2 antijenine karşı yönlendirilmiş yaklaşık 30 µg tavşan monoklonal antikorunu içermektedir.

Antikor, %0,3 taşıyıcı protein ve %0,05 koruyucu sodyum azit içeren 0,05 M Tris tamponlu salin, 0,01 M EDTA ve %0,05 Brij-35'te seyreltilir. Stok çözeltiden yaklaşık %0,25 oranında fetal kalf serumu izi bulunmaktadır.

Reaktifin toplam protein konsantrasyonu yaklaşık 16 mg/mL'dir. Spesifik antikor konsantrasyonu yaklaşık 6 µg/mL'dir. VENTANA HER2 (4B5) doku kültürü üst fazından seyreltilmiş bir tavşan IgG'dir.

Aşağıdaki konular hakkında ayrıntılı bilgi için ilgili VENTANA saptama kitinin prospektüsüne bakın: (1) Prosedür Prensipleri, (2) Gerekli Olan Fakat Ürünle Birlikte Verilmeyen Malzemeler ve Reaktifler, (3) Analiz İçin Numune Toplama ve Hazırlama, (4) Kalite Kontrol Prosedürleri, (5) Sorun Giderme, (6) Sonuçların Yorumlanması ve (7) Genel Kısıtlamalar.

GEREKEN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

VENTANA saptama kitleri gibi boyama reaktifleri ve negatif ve pozitif doku kontrol slaytları da dahil yan bileşenler sağlanmamıştır.

Pakette listelenen tüm ürünler her bölgede bulunmayabilir. Yerel destek temsilcinize danışın.

SAKLAMA

2-8°C'de saklayın. Dondurmayın.

Her çalışmadan sonra antikorun düzgün bir şekilde uygulandığından ve reaktif stabilitesinden emin olmak için, kapak yerine takılmalı ve dispenser derhal bir soğutucuya dikey konumda yerleştirilmelidir.

Her antikor kabının bir son kullanım tarihi vardır. Düzgün bir şekilde saklanması halinde, reaktif etikette belirtilen tarihe kadar stabil kalır. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

NUMUNE HAZIRLAMA

Rutin olarak işlenmiş, formalinle sabitlenip parafine gömülmüş dokular, VENTANA saptama kitleri ve VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT ve de BenchMark ULTRA otomatik slayt boyama cihazlarıyla birlikte kullanıldığında bu primer antikorla kullanım için uygundur. Önerilen doku fiksatif, %10 nötr tamponlu formalindir.² Yaklaşık 4 µm kalınlığında bölümler kesilmeli ve cam slaytların üzerine alınmalıdır. Slaytlar Superfrost Plus veya dengi olmalıdır. Ventana tarafından yapılan çalışmalar, hava etkisiyle kurutulan kesilmiş doku ve hücre dizisi kesitlerinin 2-8°C'de saklanması halinde en az 6 ay stabil kaldığını göstermektedir. Her bir laboratuvar kesilmiş slaytın stabilitesini kendi prosedürleri ve saklama ortamı koşullarına göre valide etmelidir.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. *In vitro* tanı amaçlı (IVD) kullanıma yöneliktir.
2. Kadecya veya Perjeta tedavilerine yönelik uygun olan hastaların seçimi için bu ürünün kullanımı tüm bölgelerde mevcut olmayabilir. Belirli bölgelerde mevcut olma durumunu doğrulamak için lütfen yerel Roche temsilcinize danışın.
3. Reaktiflerin göz ve mukozayla temas etmesini engelleyin. Reaktifler hassas bölgelerle temas ederse, bu bölgeleri bol suyla yıkayın.
4. İnsan veya hayvan kökenli materyaller, biyolojik olarak zararlı materyaller oldukları varsayılarak kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak atılmalıdır.
5. Yanlış sonuçlar alınmasına neden olabileceği için reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmasını önleyin.
6. Talimatlar doğrultusunda kullanıldığında, bu ürün tehlikeli madde olarak sınıflandırılmaz. Reaktifteki koruyucu, sodyum azittir. Sodyum azide aşırı maruz kalma semptomları arasında ciltte, gözlerde, mukozada ve üst solunum yolunda meydana gelen tahriş sayılabilir. Sodyum azidin bu ürünlerdeki konsantrasyonu %0,05'tir ve OSHA tehlikeli madde kriterlerini karşılamamaktadır. Na₂S birikimi, kurşun ve bakır tesisat ile reaksiyona girerek son derece patlayıcı metal azitler oluşturabilir. Attıktan sonra tesisatta azid akümülesyonunu önlemek için bol su ile sifonu çekin.¹² Hassas bireylerde sistematik alerjik reaksiyonlar görülebilir.
7. Önerilen atma yöntemleri hakkında bilgi almak için yerel veya resmi makamlara danışın.
8. Ek bilgi için ürün Güvenlik Veri Sayfası'na bakın.

BOYAMA PROSEDÜRÜ

VENTANA primer antikorları, VENTANA saptama kitleri ve aksesuarlarıyla birlikte VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT ve BenchMark ULTRA otomatik slayt boyama cihazı üzerinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Önerilen boyama protokolleri için bkz. Tablo 1 ve Tablo 2.

Bu antikor spesifik inkübasyon süreleri için optimize edilmiştir, ancak kullanıcı reaktifle elde edilen sonuçları doğrulamalıdır.

Otomatik prosedür parametreleri, cihazın Kullanıcı Kılavuzu'nda açıklanan prosedür izlenerek görüntülenebilir, yazdırılabilir ve düzenlenebilir. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleriyle ilgili ayrıntılı bilgi için ilgili VENTANA saptama kiti prospektüsüne bakın.

Tablo 1. Bir BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT cihazı ve BenchMark ULTRA cihazı üzerindeki iVIEW DAB Detection Kit ile VENTANA HER2 (4B5) için Önerilen Boyama Protokolü.

Prosedür Tipi	Yöntem		
	BenchMark ve BenchMark GX cihazı	BenchMark XT cihazı	BenchMark ULTRA cihazı
Deparafinizasyon	Seçili	Seçili	Seçili
Hücre Hazırlama (Antijen Ortaya Çıkarma)	Cell Conditioning 1, Standart	Cell Conditioning 1, Standart	ULTRA CC1, hafif
Antikor (Primer)	32 dakika, 37°C	32 dakika, 37°C	24 dakika, 36°C
A/B Blok (Biotin Bloklama)	Seçilmedi	Seçili	Seçili
Karşıt Boya (Hematoxylin)	Hematoxylin II, 4 dakika	Hematoxylin II, 4 dakika	Hematoxylin II, 4 dakika
Karşıt Boya Sonrası	Bluing, 4 dakika	Bluing, 4 dakika	Bluing, 4 dakika

Tablo 2. Bir cihazı üzerindeki ultraView ile VENTANA HER2 (4B5) için Önerilen Boyama Protokolü. BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT cihazı ve BenchMark ULTRA cihazı.

Prosedür Tipi	Yöntem	
	BenchMark, BenchMark GX ve BenchMark XT cihazı	BenchMark ULTRA cihazı
Deparafinizasyon	Seçili	Seçili
Hücre Hazırlama (Antijen Ortaya Çıkarma)	Cell Conditioning 1, Hafif	ULTRA CC1, hafif
Antikor (Primer)	16 dakika, 37°C	12 dakika, 36°C
ultraWash	Seçili	Seçili
Ters Boya	Hematoxylin II, 4 dakika	Hematoxylin II, 4 dakika
Karşıt Boya Sonrası	Bluing, 4 dakika	Bluing, 4 dakika

KALİTE KONTROL PROSEDÜRLERİ

Hücre Dizisi Sistem Kontrolleri

Ventana ayrı bir ürün olarak, parafine gömülmüş, bölümlenmiş ve tek yüklü bir slayt üzerine yerleştirilmiş, formaline fikse edilmiş dört hücre dizisi kontrolüne sahiptir. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides ürünü (katalog # 781-2991) VENTANA HER2 (4B5) ile slaytları boyamada kullanılan yöntemin ilk doğrulaması olarak faydalı olabilir. Bu dört hücre dizisi kontrolü, gen kopya sayısı için *in situ* hibridizasyon ile karakterize edilmiştir. Uygun işlenip, boyandığında, hücre çizgilerinin Tablo 4'te gösterildiği şekilde boyanması gerekir. Eğer belirtilen boyama uygun çekirdeklerde özellikle 1+ ve 2+ kontrollerde zahir değil ise dokuların boyanma işleminin tekrarlanması gerekir.

Tablo 3. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides Özellikleri

HER2 IHC Skoru	Hücre Dizisi	HER2/Chr17 Oranı*
0	MDA-MB-231	1,11
1+	T47D	1,12
2+	MDA-MB-453	2,66
3+	BT-474	5,53

* HER2/Chr17 oranı, flüoresan *in situ* hibridizasyon (FISH) kullanılarak belirlenen üç PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides lotunun ortalamasıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Her bir test koşulları seti ve gerçekleştirilen her VENTANA HER2 (4B5) boyama prosedürü için, hasta numunesiyle aynı biçimde fikse edilmiş ve işlenmiş bir pozitif kontrol doku çalışmalıdır. Bu doku hem pozitif boyanan hücre/doku bileşenlerini hem de negatif hücre dokusu bileşenlerini içerebilir ve hem pozitif hem de negatif kontrol dokusu olarak görev yapabilir. Kontrol dokusu, test kesitleriyle aynı şekilde en kısa sürede hazırlanmış ve fikse edilmiş yeni otopsi/biyopsi/cerrahi numuneleri olmalıdır. Böyle bir doku, doku hazırlamadan boyama aşamasına kadar analiz için tüm adımlarını izleyebilir. Test numunesinden farklı şekilde fikse edilen veya işlenen doku kesitinin kullanımı, fiksasyon ve doku hazırlama dışında tüm reaktifler ve yöntem adımları için kontrol sağlar. Optimum kalite kontrolü ve küçük düzeydeki reaktif bozunmalarını saptamak için yetersiz pozitif boyama gösteren bir doku güçlü pozitif boyama gösteren dokulardan daha elverişlidir. Sistemin küçük orandaki reaktif bozunmalarına veya IHC metodolojisi sorunlarına duyarlı olduğundan emin olmak için ideal olarak zayıf fakat pozitif boyama gösterdiği bilinen bir doku seçilmelidir. Bununla birlikte, genelde HER2 açısından pozitif olan neoplastik doku, patolojinin niteliği (aşırı ekspresyon) nedeniyle kuvvetli bir şekilde pozitifdir. HER2 (4B5) için pozitif kontrole örnek olarak, bilinen bir zayıf HER2 pozitif invazif meme kansinomu veya zayıf şekilde pozitif gastrik kansinom numunesi verilebilir. Pozitif boyama doku bileşenleri (neoplastik hücrelerin membran boyaması), antikorun uygulandığını ve cihazın fonksiyonunu düzgün şekilde yerine getirdiğini doğrulamak için kullanılır.

Bilinen pozitif doku kontrolleri, yalnızca işlenen dokuların ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için kullanılmalıdır; hasta numuneleri için herhangi bir tanı belirlemeye yardımcı olarak kullanılmamalıdır.

Negatif Doku Kontrolü

Pozitif kontrol dokusu için kullanılan aynı slayt (invazif duktal veya lobuler meme kansinomu veya gastrik kansinom), negatif kontrol dokusu olarak kullanılabilir. Boyanmayan bileşenler (çevreleyen stroma, lenfoid hücreler ve kan damarları), spesifik boyama olmadığını göstermeli ve primer antikor ile spesifik arka plan boyaması (yanlış pozitif) için bir gösterge sağlamalıdır. Hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde fikse edilmiş, işlenmiş ve gömülmüş bir bilinen negatif doku kullanılır.

Negative Reagent Control

Her numune için sonuçların yorumlanmasına yardımcı olacak bir negatif reaktif kontrolü yürütülmelidir. Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek için primer antikorun yerine bir negatif reaktif kontrolü kullanılır. Slayt, CONFIRM Negative Control Rabbit Ig ile boyanmalıdır. Negatif reaktif kontrolü için inkübasyon dönemi, primer antikor inkübasyon dönemine eşit olmalıdır.

Açıklanamayan Uyuşmazlıklar

Kontrollerdeki açıklanamayan uyumsuzluklar, derhal yerel destek temsilcinize yönlendirilmelidir. Kalite kontrol sonuçları teknik özelliklerle örtüşmüyorsa, hasta sonuçları geçersizdir. Bu prospektüsün Sorun Giderme bölümüne bakın. Problemi belirleyin ve düzeltin ve ardından hasta numunelerini tekrarlayın.

Tahlil Doğrulaması

Tanı amaçlı prosedürde bir antikor veya boyama sistemi ilk kez kullanılmadan önce primer antikorun spesifitesi, bilinen pozitif ve negatif dokuları temsil eden bilinen immünohistokimyasal performans özelliklerine sahip bir dizi doku üzerinde test edilerek doğrulanmalıdır (ürün prospektüsünün bu bölümünde daha önce belirtilen Kalite Kontrol Prosedürlerine, College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program'ın Kalite Kontrol önerilerine, Anatomi Patoloji Denetim Listesine¹³ ya da CLSI Approved Guideline¹⁴ veya her iki belgeye bakın). Bu kalite kontrol prosedürleri her yeni antikor lotu için veya tahlil parametrelerinde bir değişiklik olduğunda tekrarlanmalıdır. HER2 durumları bilinen meme kanseri ve gastrik kanser dokuları tahlil doğrulama işlemi için uygundur.

SONUÇLARIN YORUMLANMASI

VENTANA otomatik immünohistokimyasal boyama prosedürü, kahverengi (DAB) bir reaksiyon ürününün, VENTANA HER2 (4B5) tarafından lokalize edilen antijen bölgelerinde çökmesine neden olur. Sonuçlar yorumlanmadan önce, immünohistokimyasal prosedürlerde deneyimli bir uzman patoloj tarafından kontroller değerlendirilmeli ve boyanan ürünün yeterliliği belirlenmelidir.

Pozitif Kontroller

Tüm reaktiflerin düzgün çalıştığından emin olmak için ilk olarak, boyanmış pozitif doku kontrolü incelenmelidir. Hedef hücrelerin membranında doğru şekilde renklendirilmiş bir reaksiyon ürününün bulunması, pozitif reaktiviteye yönelik bir işaretir. Inkübasyon uzunluğuna ve kullanılan hematoksinin potansisine bağlı olarak, karşıt boyama işlemi sonucunda hücre çekirdekleri soluk ve koyu mavi bir renk olacaktır. Aşırı veya yetersiz karşıt boyama, sonuçların doğru yorumlanmasını engelleyebilir.

Pozitif doku kontrolleri, pozitif boyamayı ortaya koyamazsa, test numuneleri ile ilgili tüm sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Negatif Doku Kontrolleri

Negatif doku kontrolü, primer antikor tarafından hedef antijenin spesifik etiketlenmesini doğrulamak için pozitif doku kontrolünün ardından incelenmelidir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyama olmaması, antikorun hücrelere ve selüler bileşenlere çapraz reaktivitesinin olmadığını onaylar. Negatif doku kontrolünde spesifik boyama varsa, hasta numunesi sonucu geçersiz sayılmalıdır.

Negative Reagent Controls

Spesifik olmayan boyama (varsa) yayılmış bir görünüme sahiptir. Bağ dokusunun sporadik hafif boyanması, aşırı düzeyde formalinle fikse edilmiş doku kesitlerinde de gözlemlenebilir. Nekrotik veya dejener hücreler genellikle spesifik olmayan boyama sonuçları verdiği için, boyama sonuçlarını yorumlarken bozulmamış hücreler kullanılmalıdır.

Hasta Dokusu

Hasta numuneleri en son sırada incelenmelidir. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolündeki tüm arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir. Tüm immünohistokimyasal testlerde olduğu gibi, negatif sonuç ilgili antijenin saptanmadığı anlamına gelir, değerlendirilen hücrelerde veya dokularda antijenin olmadığı anlamına gelmez. Herhangi bir immünohistokimyasal sonuç yorumlanırken, bir hematoksin ve eozin boyamalı kesit kullanılarak her bir doku numunesinin morfolojisi de incelenmelidir. Hastanın morfolojik bulguları ve ilgili klinik veriler, uzman bir patoloj tarafından yorumlanmalıdır.

BOYAMA YORUMLARI

Meme Karsinomunda VENTANA HER2 (4B5) Yorumlaması için Skorlama Kuralları

HER2 protein aşırı ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirilen meme kansinomları, boyama yoğunluğu (0 ila 3+ ölçeğinde 2+ veya daha büyük) ve pozitif tümör hücrelerinin yüzdesine (büyüktür %10) ilişkin eşik kriterlerini karşılamalıdır. Boyama ayrıca selüler membran ile lokalize olmalıdır. Sitoplazmik boyama hala bulunabilir, fakat bu boyama pozitifliğin belirlenmesi işlemine dahil edilmez. Yalnızca iyi korunmuş ve iyi boyanmış alanlarda skorlamayı sağlamak için, tüm doku kesitini tarayın. Sitoplazmik membranı tamamen çevreleyen boyama, "2+" or "3+" yoğunluk derecesiyle skorlanmalıdır. Kısmi membran boyaması, "1+" olarak skorlanmalıdır. "1+" ile "2+" yoğunluk değerleri arasında ayırım yapabilmek için, sınır olgularının 40X veya daha yüksek büyütme oranında incelenmesi gerekebilir. 3+ yoğunluk derecesiyle skorlandırılan vakaların aksine, 2+ derecesiyle skorlandırılan boyama daha net ve daha belirgin çizilmiş bir halka gösterir. Bununla birlikte, 3+ derecesiyle skorlandırılan vakalar çok kalın bir dış çizgi sergiler. Aşağıda boyama kriterleri için bir hızlı başvuru tablosu verilmiştir. VENTANA HER2 (4B5) ile boyama fotoğrafları da içeren daha ayrıntılı bir açıklama için meme kansinomu ve gastrik kansinomun boyanması VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Yorumlama Kılavuzu'na başvurun.

Tablo 4. Meme Karsinomunda VENTANA HER2 (4B5) ile Hücre Membranı Boyama Yoğunluğu ve Modeli Kriterleri.

Boyama Modeli	Skor (Tedavi Eden Doktora Bildirin)	HER2 Boyama Değerlendirmesi
Membran boyaması gözlemlenmemiştir	0	Negatif
Kanser hücrelerinin herhangi bir bölümünde belli belirsiz, kısmi membran boyaması	1+	Negatif
Membranda zayıf tam boyama, kanseri hücrelerinin %10'undan fazla bir oranda	2+	Şüpheli*
Membranda yoğun tam boyama, kanseri hücrelerinin %10'undan fazla bir oranda	3+	Pozitif

*ISH için öneri refleksi

Gastrik Karsinomda VENTANA HER2 (4B5) Yorumlaması için Skorlama Kuralları

HER2 protein aşırı ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirilen gastrik karsinomlar, membran boyama yoğunluğu ve modeli (0 ila 3+ ölçeğinde 2+ veya daha büyük) ve pozitif tümör hücrelerinin yüzdesine ilişkin eşik kriterlerini karşılamalıdır. Boyama hücre membranına lokalize olmalıdır, ancak tamamen çevresel olması gerekmez; düzenli olarak bazolateral boyama gözlemlenir ve skorlama için dikkate alınmalıdır. Sitoplazma ve/veya çekirdek boyanması mevcut olabilir, ancak bu boyama pozitiflik belirlenmesine dahil olmaz. Gastrik karsinomda, pozitif tümör hücrelerinin yüzdesi numunenin bir biyopsi numunesi (≥5 kohezif hücre) ya da rezeksiyon numunesi (≥%10) olmasına göre değişir.

Gastrik kanserde HER2 immünohistokimyası için skorlama kılavuzları belirlenirken,¹⁵ kuvvetli membran boyama neoplastik hücrelerde HER2 proteini aşırı ekspresyonunun kanıtı olmakla birlikte, tamamen çevresel olması gerektiğini unutmayın.

Rüschoff ve ark., gastrik kanserde çekirdek boyamayla veya çekirdek boyama olmadan dağınık sitoplazmik boyama rapor etmiştir.¹⁶ Gastrik kanserde HER2 proteini ekspresyonunun belirlenmesinde yalnızca membran boyama kullanılmalıdır.

Clone 4B5 ile immünohistokimyasal boyama, normal gastrik mukozada sitoplazma ve çekirdek boyanmasını ve daha seyrek olarak da gastrik karsinom ve gastrik özofageal karsinomda neoplastik hücrelerin boyanmasını sağlayabilir. Bu sitoplazmik ve çekirdeksel boyamanın doğası şu an için bilinmemektedir. Bu boyama modeli ayrı membran boyama ile karıştırılmamalıdır; bu ikincisi neoplastik hücrelerde HER2 pozitifliğinin göstergesidir.

VENTANA HER2 (4B5) ile boyama fotomikrografları da içeren daha ayrıntılı bir açıklama için meme karsinomu ve gastrik karsinomun boyanması VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Yorumlama Kılavuzu'na başvurun.

Tablo 5. Gastrik Karsinomda VENTANA HER2 (4B5) ile Hücre Membranı Boyama Yoğunluğu ve Modeli Kriterleri.

Boyama Modeli - Rezeksiyon Numunesi	Boyama Modeli - Biyopsi Numunesi	Skor (İsteyen hekime rapor edin)	HER2 Boyama Değerlendirmesi
Tümör hücrelerinin <%10'unda hiç reaktivite veya membranöz reaktivite yok	Tümör hücrelerinin hiçbirinde hiç reaktivite veya membranöz reaktivite yok	0	Negatif
Tümör hücrelerinin ≥%10'unda belirsiz/çok zor fark edilen membranöz aktivite; hücreler yalnızca membranlarının bir kısmında reaktif	Boyanan tümör hücrelerinin sayısına bakılmaksızın, belirsiz/çok zor fark edilen membranöz reaktiviteye sahip tümör hücre kümesi*	1+	Negatif
Tümör hücrelerinin ≥%10'unda zayıf ila orta, tam, bazolateral veya lateral membranöz reaktivite	Boyanan tümör hücrelerinin sayısına bakılmaksızın, zayıf ila orta, tam, bazolateral veya lateral membranöz reaktiviteye sahip tümör hücre kümesi	2+	Şüpheli**
Tümör hücrelerinin ≥%10'unda kuvvetli, tam, bazolateral veya lateral membranöz reaktivite	Boyanan tümör hücrelerinin sayısına bakılmaksızın, kuvvetli, tam, bazolateral veya lateral membranöz reaktiviteye sahip tümör hücre kümesi	3+	Pozitif

*≥5 kohezif hücreler

** ISH için öneri refleksi

KISITLAMALAR

Genel Kısıtlamalar

1. İmmünohistokimya; uygun reaktiflerin, doku seçimlerinin, fiksasyonun, işlemin belirlenmesinde, immünohistokimya slaytının hazırlanmasında ve boyama sonuçlarının yorumlanmasında uzmanlık eğitimi gerektiren çok aşamalı bir teşhis sürecidir.
2. Doku boyama, boyama öncesi dokunun ele alınmasına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular ve sıvılarla kontaminasyon, artefaktlara, antikör tuzaklanmasına veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. İstikrarsız sonuçlar sabitleme ve gömme yöntemlerinden veya doku içerisinde var olan düzensizliklerden kaynaklanabilir.
3. Aşırı veya yetersiz karşıt boyama, sonuçların doğru yorumlanmasını engelleyebilir.
4. Herhangi bir pozitif boyamanın varlığı veya yokluğuyla ilgili klinik yorumlar, klinik hikaye, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler bağlamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir boyamanın bulunması veya bulunmamasıyla ilgili yapılan klinik yorumlar, morfolojik incelemeler ve doğru kontrollerin yanı sıra diğer tanı amaçlı testler de yapılarak tamamlanmalıdır. Boyanan preparatı yorumlamak için kullanılan antikörleri, reaktifleri ve yöntemleri bilmek uzman bir Patoloğun sorumluluğundadır. Boyama işlemi, boyanan slaytları incelemekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu bir Patoloğun gözetimi altında onaylı ve lisanslı bir laboratuarda gerçekleştirilmelidir.

- Ventana, verilen talimatların izlenmesi halinde antikorları ve reaktifleri kullanım için en uygun düzeyde seyreltilmiş olarak sağlamaktadır. Önerilen test prosedürlerinden sapmak, beklenen sonuçları geçersiz kılabilir. Uygun kontroller uygulanmalı ve belgelenmelidir. Önerilen test prosedürlerinden sapan kullanıcılar, hasta sonuçlarının yorumlanmasıyla ilgili sorumluluğu üstlenmelidir.
- Bu ürün, akış sitometrisinde kullanıma yönelik değildir; performans özellikleri belirlenmemiştir.
- Reaktifler, önceden test edilmemiş dokularda beklenmedik reaksiyonlar gösterebilir. Neoplazmalar veya diğer patolojik dokulardaki antijen ekspresyonunun biyolojik çeşitliliği nedeniyle, test edilen doku gruplarında bile beklenmedik reaksiyon olasılığı tamamen ortadan kaldırılamaz.¹⁷ Belgelenen beklenmedik reaksiyonlarla birlikte yerel destek temsilcinize başvurun.
- Hepatit B virüsüyle enfekte olan ve hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) taşıyan kişilerden alınan dokular, horseradish peroksidaz ile spesifik olmayan boyama sergileyebilir.¹⁸
- Proteinlerin veya substrat reaksiyonu ürünlerinin immünojenik olmayan şekilde bağlanması nedeniyle hatalı pozitif sonuçlar görülebilir. Bunlar ayrıca, kullanılan immünohistokimyasal boyanın türüne bağlı olarak psödoperoksidaz aktivitesi (eritrositler), endojenöz peroksidaz aktivitesi (sitokrom C) veya endojenöz biotinden de kaynaklanabilirler (örn. karaciğer, beyin, meme, böbrek).¹⁹
- Tüm immünohistokimya testlerinde olduğu gibi, negatif sonuç ilgili antijenin saptanmadığı anlamına gelir, değerlendirilen hücrelerde veya dokularda antijenin olmadığı anlamına gelmez.

ÖZEL KISITLAMALAR

- Antikor, tablo 1 ve 2'de belirtildiği üzere VENTANA platformları ve saptama kimyasalları için optimize edilmiştir. Doku fiksasyonu ve işlemesindeki değişkenlikler nedeniyle, bağımsız numunelerde primer antikor inkübasyon süresinin artırılması veya azaltılması gerekebilir. Fiksasyon değişkenleri hakkında daha fazla bilgi için, bkz. "Immunohistochemistry Principles and Advances".²⁰
- VENTANA saptama kiti ve aksesuarlarıyla birlikte kullanılan antikor, rutin formalin fiksasyonu, doku işleme ve kesitlere ayırma işlemlerinde geri kalan antijenleri saptar. Önerilen test prosedürlerinden sapan kullanıcılar, hasta sonuçlarının yorumlanması ve validasyonu ile ilgili sorumluluğu üstlenir.
- Kemik iliği, spesifte için test edilmemiştir. Kullanıcı, boyama bilgilerini yorumlamadan önce yukarıda belirtilen dokulardaki uygun boyamayı belirlemelidir.
- Clone 4B5 ile immünohistokimyasal boyama, normal gastrik mukozada sitoplazma ve çekirdek boyanmasını ve daha seyrek olarak da gastrik karsinom ve gastrik/özofageal karsinomda neoplastik hücrelerin boyanmasını sağlayabilir. Bu sitoplazmik ve çekirdeksel boyamanın doğası şu an için bilinmemektedir. Bu boyama modeli ayrı membran boyama ile karıştırılmamalıdır; bu ikincisi neoplastik hücrelerde HER2 pozitifliğinin göstergesidir.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

VENTANA HER2 (4B5) antikorunun performansı, spesifiklik, tekrar edilebilirlik ve yöntem karşılaştırma çalışmaları değerlendirilmiştir. Aksi belirtilmedikçe tüm boyamalar, bir Benchmark XT otomatik slayt boyama cihazında, yukarıda listelenen VUEW DAB Detection Kit protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler önce meme karsinomu ve sonra da gastrik karsinom için sunulmaktadır.

- Spesifte: Clone 4B5'in spesifikliği, çoğu normal doku için hiçbir spesifik membran boyaması göstermeyen bir çalışmayla belirlenmiştir. Boyama sonuçları şu şekildedir: adrenal (0/3), meme (0/3), serebellum (0/3), serebrum (0/3), serviks (0/3), kolon (0/3), özofagus (1/3), kalp (0/2), böbrek (0/3), karaciğer (0/3), akciğer (0/3), mezotelyal hücreler (0/3), over (0/3), pankreas (0/3), paratiroid (1/3), fokal membran boyama), periferik sinir (1/3), hipofiz (0/2), prostat (1/3), tükürük bezi (0/3), iskelet kası (0/3), deri (0/3), ince bağırsak (0/3), dalak (0/3), mide (0/3), testis (0/3), timus (0/2), tiroid (0/3), tonsil (2/3 yüzey epitelyal hücrelerinde fokal boyama) ve uterus (0/3).
Clone 4B5'in spesifikliği ayrıca, çoğu neoplastik dokuda hiçbir spesifik membran boyaması göstermeyen bir çalışmayla da belirlenmiştir. Boyama sonuçları şu şekildedir: meme kanseri (1/4), karsinoid (0/2), kolon kanseri (1/3), hepatosellüler kanser (0/5), leiomyom (0/2), akciğer kanseri (0/2), lenfoma (0/3), melanom (0/2), over kanseri (1/2), pankreas kanseri (0/3), prostat kanseri (0/3), renal hücreli kanser (0/5), sarkom (0/2), mide kanseri (0/3), tiroid kanseri (0/3) ve indifferansiyel kanser (0/1).
Bademcik epitelyumu, özofageal epitelyum, prostat, periferik sinir, paratiroid, meme kanseri, kolon ve over kanserinde pozitif boyama, HER2 ekspresyonu bakımından yayımlanmış literatür ile tutarlıdır.

- Hassasiyet: Hassasiyet Tablo 9 ve 11'de gösterilmiştir: FISH ile Karşılaştırıldığında Üç Patoloğun Konsensüs Clone 4B5 IHC Skorları.
- Benchmark ve Benchmark XT boyama cihazı platformlarında boyamanın çalışma içi tekrar edilebilirliği, beş meme kanseri dokusunun üzer slaydının boyanması ve 0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 ekspresyonu skorları ile belirlenmiştir. Her vaka için, 3 slayttan üçü tek bir çalışmada ve test edilen tüm cihaz platformlarında uygun şekilde boyandı. Kullanıcılar tek bir işlemde düşük, orta ve yüksek antijen yoğunluğuyla farklı seri kesit gruplarını boyayarak çalışma içi tekrar elde edilebilirliği doğrulamalıdır.
- Boyamanın çalışmalar arası ve platformlar arası tekrar edilebilirliği, Benchmark ve Benchmark XT cihaz platformları genelinde, üç farklı cihaz çalışmada, beş meme kanseri dokusunun üzer slaydının boyanması ve 0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 ekspresyonu skorları ile belirlenmiştir. Her vaka için, 9 slayttan dokuzu üç cihaz çalışmada ve test edilen tüm cihaz platformlarında uygun şekilde boyandı.
- Benchmark XT cihazının laboratuvarlar arası boyama ve okuyucular arası skorlama tekrar edilebilirliği: Laboratuvarlar arası tekrar edilebilirlik çalışmasına üç laboratuvar katılmıştır. 40 nötr tamponlu formaline fikse edilmiş invazif meme karsinomu vakasının kesik slaytları [her bir HER2 gruplama kategorisinden 10'ar adet (0-1+, 2+, 3+)] ve altı (6) PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides önerilen boyama protokolü kullanılarak, VENTANA Benchmark XT otomatik slayt boyama platformunda boyanmak üzere her bir merkeze gönderilmiştir. Kontroller PATHWAY HER-2 4'te 1 Control Slides'i ve her vakadan negatif Ig reaktifi ile boyanmış ikinci bir slaydı içeriyordu. Tesislerden hiçbirinde kontrollerin performansına bağlı geçersiz bir çalışma olmadı. Sonuçlar Ventana tarafından analiz edildi. Kırk slayttan otuz dördü (34/40), tüm boyama tesislerinde benzer boyama yoğunluğu sergiledi. Altı numune (6/40 veya %15) maksimum 1 yoğunluk düzeyinde değişkenlik gösterdi. Üç (3/6) numune, her ikisi de negatif kabul edilen 0 ila 1+ düzeyleri arasında değişkenlik gösterdi. İki numune (2/40 veya %5) 2+ ve 3+ arasında değişkenlik gösterdi ve bir numune (1/40) 1+ ve 2+ arasında değişkenlik gösterdi.
- Benchmark XT cihazı okuyucular arası skorlama tekrar edilebilirliği: 40 vakanın tümünde (%100), 3 patoloğdan en az 2'si hemfikirli.
- Lotlar arası tekrar elde edilebilirlik, HER2 ekspresyonu skoru 0, 1+, 2+, ve 3+ olan 5 meme kanseri dokusunun 3 lot HER2 (4B5) ile otomatik olarak boyanmasıyla belirlendi. Boyanan dokular, üç uzman okuyucu tarafından 0 ila 3+ arasındaki bir ölçekle skorlandı. Boyanan 3 slayt ve 5 doku için lotlar ve okuyucular arasında %100 uyum vardı.
- Clone 4B5 taşıyan monoklonal antikor ile klon PATHWAY HER-2/neu (CB11) fare monoklonal antikor arasındaki karşılaştırma çalışmaları: Yapılan Çalışmaların Özeti. clone 4B5'in her ikisi de önceden onaylanmış FDA tanı testleri olan PATHWAY HER-2/neu (CB11) ve PathVysion Her-2 FISH ile korelasyonunu incelemek amacıyla bir yöntem karşılaştırma çalışması yapıldı. Altı araştırmacı çalışmaya katıldı. Üç farklı araştırmacıdan oluşan iki grup, iki bağımsız kohortu (Kohort 1: n=178, Kohort 2: n=144) PATHWAY HER-2/neu (CB11) ve clone 4B5 ile boyanan göğüs kanserli vakaları kullanarak değerlendirdi. FISH verileri, hasta hikayesinden elde edildi. HER2 skorlama ile ilgili okuyucular arasındaki bilinen değişkenliği azaltmak adına her vaka için üç okuyucudan her antikor başına ortak bir skor alındı.^{21,22,23} Toplam 322 vaka değerlendirildi. PATHWAY HER-2/neu (CB11) ile boyanan slaytlar PATHWAY HER-2/neu (CB11) paket insertinde belirtilen üretici talimatlarına göre işlendi ve boyandı. PATHWAY HER-2/neu (CB11) ile boyanan slaytların boyanması ve okunması arasında ortalama yaklaşık bir yıllık bir süre vardı. Altı okuyucunun birinden gelen skorların güven aralığının (CI) dışında olması nedeniyle, iki kohorta ait veriler aşağıdaki şekilde sunulmuştur:

Karşılaştırma Çalışması Numunelerinin Patologlar Arası Tekrar Elde Edilebilirliği
Tablo 6. Kohort 1: Üç Patoloğun Konsensüs IHC Skorları.

Clone 4B5 Skoru	PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru			
	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Toplam	31	37	75	143

Kohort 1: 3 x 3 Sunum için performans özellikleri.

Toplam uyum $29+13+53/143 = \%66,4$ (%95 CI = %38,6, %59,7).

Kohort 1: 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (HER-2 antikor pozitif (2+ ve 3+) ve negatif (0+ ve 1+) skorları birleştirilmiştir).

- Pozitif yüzde uyum $29+2+24+13/31+37 = \%100$ (%95 CI = %97,5 – %100).
- Negatif yüzde uyum $53/75 = \%70,7$ (%95 CI = %58,5 – %80,1).

Toplam uyum $29+2+2+13+53/143 = \%84,7$ (%95 CI = %78,2 – 90,0).

Tablo 7. Kohort 2: Üç Patoloğun Konsensüs IHC Skorları.

Clone 4B5 Skoru	PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru			
	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Toplam	73	20	85	178

Kohort 2: 3 x 3 Sunum için performans özellikleri.

Toplam uyum $72+12+80/178 = \%92,1$ (%95 CI = %80,1, %93,1).

Kohort 2: 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (HER2 antikor pozitif (2+ ve 3+) ve negatif (0+ ve 1+) skorları birleştirilmiştir).

- Pozitif yüzde uyum $72+12+1+73/20 = \%92,5$ (%95 CI = %85,2 – %96,9).
- Negatif yüzde uyum $80/85 = \%94,1$ (%95 CI = %86,8 – %98,1).

Toplam uyum $72+12+1+1+80/178 = \%93,3$ (%95 CI = %88,5 – %96,4).

Tablo 8. Kohort 1: Üç Patoloğun FISH'e Kıyasla Konsensus PATHWAY HER-2/neu (CB11) IHC Skorları

PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru	FISH Sonucu		
	Pozitif	Negatif	Toplam
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Toplam	86	58	144

Kohort 1: PATHWAY HER-2/NEU (CB11) ve FISH, 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (2 ve 3'ün skorları pozitif kabul edilmiştir).

- Pozitif yüzde uyum $32+32/86 = \%74,4$ (%95 CI = %63,8 – %83,2).
- Negatif yüzde uyum $53/58 = \%91,4$ (%95 CI = %80,9 – %97,1).

Toplam uyum $32+32+53/144 = \%81,2$ (%95 CI = %73,9 – %87,2).

Tablo 9. Kohort 1: FISH ile Karşılaştırıldığında Üç Patoloğun Konsensüs Clone 4B5 IHC Skorları

Clone 4B5 Skoru	FISH Sonucu		
	Pozitif	Negatif	Toplam
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Toplam	86	58	144

3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Toplam	86	58	144

Kohort 1: Clone 4B5 ve FISH 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (burada, 2 ve 3'ün skorları pozitif kabul edilmektedir).

- Pozitif yüzde uyum $55+25/86 = \%93,0$ (%95 CI = %87,9 – %96,3).
- Negatif yüzde uyum $47/58 = \%81,0$ (%95 CI = %73,4 – %86,0).

Genel uyum $55+25+47/144 = \%88,2$ (%95 CI = %82,1 – %92,2).

Tablo 10. Kohort 2: Üç Patoloğun FISH'e Kıyasla Konsensus PATHWAY HER-2/neu (CB11) IHC Skorları

PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru	FISH Sonucu		
	Pozitif	Negatif	Toplam
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Toplam	93	85	178

Kohort 2: PATHWAY HER-2/neu (CB11) ve FISH, 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (2 ve 3'ün skorları pozitif kabul edilmiştir).

- Pozitif yüzde uyum $72+13/93 = \%91,3$ (%95 CI = %85,0 – %96,7).
- Negatif yüzde uyum $77/85 = \%90,6$ (%95 CI = %83,9 – %96,3).

Genel uyum $72+13+77/178 = \%91,0$ (%95 CI = %86,5 – %94,9).

Tablo 11. Kohort 2: FISH ile Karşılaştırıldığında Üç Patoloğun Konsensüs Clone 4B5 IHC Skorları

Clone 4B5 Skoru	FISH Sonucu		
	Pozitif	Negatif	Toplam
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Toplam	93	85	178

Kohort 2: Clone 4B5 ve FISH 2 x 2 Sunum için performans özellikleri (burada, 2 ve 3'ün skorları pozitif kabul edilmektedir).

- Pozitif yüzde uyum $72+11/93 = \%89,2$ (%95 CI = %82,5 – %95,1).
- Negatif yüzde uyum $77/85 = \%90,6$ (%95 CI = %84,0 – %96,4).

Genel uyum $72+11+77/178 = \%90,0$ (%95 CI = %85,4 – %93,6).

Karşılaştırma Çalışması Numunelerinin Patologlar Arası Tekrar Elde Edilebilirliği

İmmünohistokimya slaytlarının farklı patologlar tarafından farklı yorumlanabileceği gerçeğinden yola çıkılarak, iki kohorttan her biri için üç patoloğun tüm numuneleri okumakla görevlendirildi (toplam 6 patoloğun). Nihai sonuçları karara bağlamak için üçte iki kuralı uygulandı. Aşağıda her bir kohortun karşılaştırma çalışması numuneleriyle ilgili üç patoloğun tarafından elde edilen değişken sonuçların bir özeti verilmiştir.

Tablo 12. Kohort 1: Üç Patolog için Clone 4B5 Skorlaması.

HER2 Skoru	Clone 4B5 Skoru		
	Araştırmacı 1	Araştırmacı 2	Araştırmacı 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Toplam	174	178	178
Not: Toplam 3 numune üç Patolog tarafından değerlendirildiğinde bir derece seviyeden daha fazla değişkenlik gösterdi (örn. 0, 2+). Numune 1: Bir patolog 2+ olarak skorlandı, iki patolog 0+ olarak skorlandı. Numune 2: Bir patolog 0+ olarak skorlarken, iki patolog 2+ olarak skorlandı. Numune 3: Bir patolog 0+, ikincisi 1+ ve üçüncüsü de 2+ olarak skorlandı.			

Tablo 13. Kohort 1: Üç Patolog için PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skorlaması.

HER2 Skoru	PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru		
	Araştırmacı 1	Araştırmacı 2	Araştırmacı 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Toplam	174	178	178
Not: Üç patolog tarafından değerlendirildiğinde, toplam 1 numune bir derecenin üzerinde bir düzeyde (yani, 1 - 3+) farklılık göstermiştir. Numune 1: Bir patolog 1+, ikinci patolog 2+, ve üçüncü patolog 3+ ile skorlandı.			

Tablo 14. Kohort 2: Üç Patolog için Clone 4B5 Skorlaması.

HER2 Skoru	Clone 4B5 Skoru		
	Araştırmacı 4	Araştırmacı 5	Araştırmacı 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Toplam	141	144	144
Not: Toplam 6 numune, üç patolog tarafından değerlendirildiğinde birden fazla derece düzeyince (örn., 0, 3+) değişkenlik gösterdi. Numune 1: Bir patolog 0+, ikincisi 0+ ve üçüncüsü de 2+ olarak skorlandı. Numune 2: Bir patolog 1+, ikincisi 1+ ve üçüncüsü de 3+ olarak skorlandı. Numune 3: Bir patolog 0+, ikincisi 2+ ve üçüncü patolog da 2+ olarak skorlandı. Numune 4 ve 5: Bir patolog 0+, ikincisi 2+ ve üçüncüsü de 2+ olarak skorlandı. Numune 6: Bir patolog 0+, ikincisi 3+ ve üçüncüsü de 3+ olarak skorlandı.			

Tablo 15. Kohort 2: Üç Patolog için PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skorlaması.

HER2 Skoru	PATHWAY HER-2/neu (CB11) Skoru		
	Araştırmacı 4	Araştırmacı 5	Araştırmacı 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Toplam	144	144	144
Not: Toplam 8 numune, üç Patolog tarafından değerlendirildiğinde bir derecenin üzerinde bir düzeyde (yani 0 - 2+) farklılık göstermiştir. Numune 1-6: Bir patolog 0+, ikincisi 1+ ve üçüncüsü de 2+ olarak skorlandı. Numune 7 ve 8: Bir patolog 0+, ikincisi 2+ ve üçüncüsü de 2+ olarak skorlandı.			

Aşağıdaki tabloda, patolog çiftleri (her kohort için üç çift) arasındaki yüzde uyumlarının aralıkları verilmiştir.

Tablo 16. Aralıklar 2X2*. Üç Patoloğun Uyum Durumları.

	Toplam Yüzde Uyum	Pozitif Yüzde Uyum	Negatif Yüzde Uyum
Clone 4B5 - PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
Kohort 1	82,6 – %86,9	97,3 – %100,0	68,0 – %75,4
Kohort 2	88,2 – %95,5	87,6 – %95,6	86,1 – %95,4
Clone 4B5 - FISH			
Kohort 1	86,8 – %88,2	90,7 – %94,2	79,3 – %81,0
Kohort 2	87,4 – %89,9	88,2 – %90,0	84,5 – %91,8
PATHWAY HER-2/neu (CB11) - FISH			
Kohort 1	79,9 – %84,0	73,3 – %80,2	89,7 – %89,7
Kohort 2	84,8 – %93,3	86,7 – %92,5	82,7 – %94,1

* 0, 1+ = Negatif. 2+ ve 3+ = Pozitif.

Sonuç: Bu çalışmalardan elde edilen veriler, clone 4B5 primer antikorunun, normal ve neoplastik dokular için uygun membran boyamayı bulma kabiliyeti bakımından tekrar edilebilir ve spesifik olduğunu göstermiştir. Yöntem karşılaştırması verileri, clone 4B5 primer antikorunun, Herceptin tedavisinin düşünüldüğü meme kanseri hastalarının değerlendirilmesinde yardımcı bir araç olarak endike olduğunu kanıtlamıştır.

9. **VIEW DAB Detection Kit veya ultraView Universal DAB Detection Kit kullanımıyla BenchMark ULTRA cihazında performans özellikleri:**

BenchMark ULTRA cihazının laboratuvarlar arası boyama ve günler arası tekrar edilebilirliği: Laboratuvarlar arası tekrar elde edilebilirlik çalışmasına, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki üç ayrı enstitüden üç laboratuvar katıldı. 48 FFPE invazif meme kanserini vakasının kesik slaytları [her bir HER2 gruplama kategorisinden 12'er adet (0, 1+, 2+, 3+)] ve 12 boyama çalışmasının her biri için 1 çift PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, önerilen boyama protokolü ve ultraView Universal DAB Detection Kit kullanılarak VENTANA BenchMark ULTRA otomatik slayt boyama cihazında boyanmak üzere çalışma merkezlerine dağıtılmıştır. Kontroller PATHWAY HER-2 4'te 1 Control Slides'ı ve her vakadan negatif Ig reaktif ile boyanmış ikinci bir slaydı içeriyordu. Vaka durumu hakkında karşılaştırılmış olan patologlar, slaytları değerlendirdi ve bir klinik skor (0, 1+, 2+, 3+) verdi. Sonuçlar Ventana tarafından analiz edildi. 2x2'lik tablolar için standart nomenklatür kullanımıyla, merkezler çapında ortalama pozitif uyum (APA) $[2a/(2a+b+c)]$ olarak ve ortalama negatif uyum (ANA) $[j2d/(2d+b+c)]$ olarak hesaplanmıştır. Tüm tesisler genelinde, klinik değerlendirmeye dayanan tesisler arası APA (pozitif, negatif) %90,0'dı (108/120) ve ANA %92,9'du (156/168). Tesislerin çiftler açısından karşılaştırılmasında, APA $a/(a+c)$ olarak hesaplandı ve

ANA d/(b+d) olarak hesaplandı. Tesisler arası APA oranları; Tesis A'ya karşı Tesis B, Tesis A'ya karşı Tesis C ve Tesis B'ye karşı Tesis C için sırasıyla %93,0 (40/43), %87,2 (34/39) ve %89,5 (34/38) olarak gerçekleştirmiştir. Tesisler arası ANA oranları; Tesis A'ya karşı Tesis B, Tesis A'ya karşı Tesis C ve Tesis B'ye karşı Tesis C için sırasıyla %94,3 (50/53), %91,2 (52/57) ve %93,1 (54/58) olarak gerçekleştirmiştir.

Aşağıdaki tablolarda, 2+ ve 3+ skorlarının ayrı tutulduğu klinik skora dayalı tek tek okuyucu sonuçlarının 3x3'lük sunumları verilmektedir.

Tablo 17. Merkez A – Merkez B Laboratuvarlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi–clone 4B5 BenchMark ULTRA ile birlikte ultraView Universal DAB Detection Kit.

Tesis A	Tesis B			
	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Toplam	12	9	27	48
Toplam yüzde uyumu (OPA): n/N (%)				43/48 (89,6)

Tablo 18. Merkez A – Merkez C Laboratuvarlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi– Clone 4B5 BenchMark ULTRA cihazıyla birlikte ultraView Universal DAB Detection Kit.

Tesis A	Tesis C			
	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Toplam	12	5	31	48
Toplam yüzde uyumu (OPA): n/N (%)				42/48 (87,5)

Tablo 19. Merkez B – Merkez C Laboratuvarlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi– Clone 4B5 BenchMark ULTRA cihazıyla birlikte ultraView Universal DAB Detection Kit.

Tesis B	Tesis C			
	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Toplam	12	5	31	48
Toplam yüzde uyumu (OPA): n/N (%)				44/48 (91,7)

10. BenchMark ULTRA cihazı günler arası boyama tekrar edilebilirliği:

Çalışmanın günler arası tekrar edilebilirlik (IDR) kısmında, her bir klinik skorda (0, 1+, 2+, 3+) yaklaşık üç (3) vakanın amaçlanan dağılımıyla 12 vaka yer almıştır. Toplamda, çalışmanın IDR kısmının yürütüldüğü tek bir kurumdaki (Merkez C) BenchMark ULTRA cihazında yürütülen beş çalışma, kesinlikle ardı ardına iki boyama günü olmayacak şekilde en az 20 günlük bir sürede gerçekleşmiştir. Tüm günler genelinde Merkez C'de Clone 4B5 boyamasının klinik değerlendirmesine dayalı IDR APA ve ANA oranlarının ikisi de %100'dür. Günler arası karşılaştırmalar için klinik skorlara dayanan toplam yüzde uyumu oranları (OPA), günden güne karşılaştırmalardan her biri için ve birleşik olarak tüm günler için %100'dü.

11. BenchMark ULTRA boyama platformunu BenchMark XT boyama platformlarıyla karşılaştırma çalışması:

Platform karşılaştırma çalışmasına, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki iki boyama laboratuvarı ve üç okuma tesisi katıldı. 280 FFPE invazif meme kansinomu vakasının kesik slaytları [her bir HER2 gruplama kategorisinden yaklaşık 70 vaka (0, 1+, 2+, 3+)], ilgili önerilen boyama protokolleri ve ultraView Universal DAB Detection Kit kullanılarak bir BenchMark XT cihazında ve bir BenchMark ULTRA cihazında boyanmak üzere iki boyama merkezine (her bir merkeze 140 vaka) rasgele olarak dağıtılmıştır. Kontroller PATHWAY HER-2 4'te 1 Control Slides'i ve her vakadan negatif Ig reaktif ile boyanmış ikinci bir slaydı içeriyordu. Merkez 1 ve Merkez 2'den alınan boyanmış vakalar dört slayt kümesine bölünmüş ve Merkez 1'den bir, Merkez 2'den bir ve Merkez 3'den bir okuyucu şeklinde her seferinde bir küme olmak üzere üç farklı uzman okuyucuya (patolog) verilmiştir. Vaka durumu ve boyama platformu için körleştirilmiş koşulların uygulandığı patologlar dört slayt kümesinin tümünü değerlendirmiş ve her vaka için bir klinik skor vermişlerdir (yani, 0, 1+, 2+, 3+). Sonuçlar Ventana tarafından analiz edildi. BenchMark XT cihazına karşı BenchMark ULTRA cihazındaki clone 4B5 antikor boyama işlemi için klinik değerlendirmeye dayalı (pozitif, negatif) PPA oranları (ve çift taraflı %95 güven aralıklarının alt sınırı) A, B ve C okuyucuları için sırasıyla %91,6 (85,9), %91,2 (85,3) ve %94,9 (89,3) bulunmuştur. BenchMark XT cihazına karşı BenchMark ULTRA cihazındaki Clone 4B5 antikor boyama işlemi için klinik değerlendirmeye dayalı (pozitif, negatif) NPA oranları (ve çift taraflı % 95 güven aralıklarının alt sınırı) A, B ve C okuyucuları için sırasıyla %91,9 (85,8), %93,8 (88,3), ve %99,3 (96,3) bulunmuştur. BenchMark XT cihazına karşı BenchMark ULTRA cihazı kullanımıyla yapılan Clone 4B5 boyama işlemleri arasındaki OPA, klinik değerlendirmenin (pozitif, negatif) 2x2 analizine dayalı olarak, A, B ve C okuyucuları için sırasıyla %91,8, %92,5 ve %97,4 bulunmuştur. Klinik skora (0/1+, 2+, 3+) göre her bir okuyucu için platformlar arası uyumun 3x3 sunumu aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir:

Tablo 20. BenchMark ULTRA cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi–Okuyucu A.

BenchMark ULTRA cihazı	BenchMark XT cihazı			
Okuyucu A	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Toplam	96	47	124	267
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI)				226/267 (84,6) (79,8 – 88,5)

Tablo 21. BenchMark ULTRA cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi–Okuyucu B.

BenchMark ULTRA cihazı	BenchMark XT cihazı			
Okuyucu B	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Toplam	69	68	130	267
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI)				242/267 (90,6) (86,5 – 93,6)

Tablo 22. BenchMark ULTRA cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları, 3x3 Analizi–Okuyucu C.

BenchMark ULTRA cihazı	BenchMark XT cihazı			
Okuyucu C	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Toplam	66	52	149	267
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI) 257/267 (96,3) (93,2 – 98,0)				

12. **Platform karşılaştırma çalışmaları numunelerinin patoloğlar arası tekrar edilebilirliği:**

Her platform için okuyucular arasında altı olası ikili karşılaştırmaya ilişkin pozitif ve negatif uyum oranlarıyla birlikte iki taraflı skor %95 güven aralıkları hesaplanmıştır. BenchMark ULTRA cihazıyla ilgili, Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için PPA oranları sırasıyla %94,7 (126/133), %98,2 (111/113), %98,2 (111/113), %89,4 (126/141), %78,7 (111/141) ve %83,5'ti (111/133). Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için NPA oranları sırasıyla %88,8 (119/134), %80,5 (124/154), %85,7 (132/154), %94,4 (119/126), %98,4 (124/126) ve %98,5'ti (132/134). OPA oranı Okuyucu A ve Okuyucu B arasında en yüksek (%91,8) değerdeydi ve Okuyucu B ve Okuyucu C (%91,0) ile Okuyucu A ve Okuyucu C (%88,8) arasında daha düşük değerdeydi.

BenchMark XT cihazıyla ilgili, Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için PPA oranları sırasıyla %94,9 (130/137), %98,3 (116/118), %98,3 (116/118), %90,9 (130/143), %81,1 (116/143) ve %84,7'yd (116/137). Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için NPA oranları sırasıyla %90,0 (117/130), %81,9 (122/149), %85,9 (128/149), %94,4 (117/124), %98,4 (122/124) ve %98,5'ti (128/130). OPA oranı Okuyucu A ve Okuyucu B arasında en yüksek (%92,5) değerdeydi ve Okuyucu B ve Okuyucu C (%91,4) ile Okuyucu A ve Okuyucu C (%89,1) arasında daha düşük değerdeydi.

13. **VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit karşılaştırma çalışması:**

140 FFPE invazif meme kanserinden oluşan Merkez 1 kohortu [her bir HER-2 gruplama kategorisinden yaklaşık 35 vaka (0, 1+, 2+, 3+)], BenchMark ULTRA otomatik slayt boyama cihazında Clone 4B5 ile boyama yaparken VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit kitlerinin karşılaştırma çalışmasında kullanılmıştır. Saptama kiti karşılaştırma çalışmasına, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bir boyama laboratuvarı ve üç okuma tesisi katıldı. BenchMark ULTRA cihazında Clone 4B5 antikor boyamasında, VIEW DAB Detection Kit ve ultraView Universal DAB Detection Kit yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar arasındaki PPA oranları klinik değerlendirmeye (pozitif, negatif) göre Okuyucu A, B ve C için sırasıyla %95,8 (68/71), %96,9 (63/65) ve %96,5 (55/57) ve saptama yöntemleri arasındaki NPA oranları da yine Okuyucu A, B ve C için sırasıyla %90,8 (59/65), %91,5 (65/71) ve %97,5 (77/79) bulunmuştur. Saptama kitleri arasında OPA oranları, Okuyucu A, B ve C için sırasıyla %93,4 (127/136), %94,1 (128/136) ve %97,1 (132/136) çıkmıştır. Klinik skora (0/1+, 2+, 3+) göre her bir okuyucu için saptama karşılaştırması uyumunun 3x3 sunumu aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir:

Tablo 23. Okuyucu A, VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit Uyum Oranları, 3x3 Analizi– BenchMark ULTRA cihazında Clone 4B5 Boyaması.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Okuyucu A	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Toplam	46	25	65	136
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI)				119/136 (87,5) (80,9 – 92,0)

Tablo 24. Okuyucu B, VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit Uyum Oranları 3x3 Analizi– BenchMark ULTRA cihazında clone 4B5 Boyaması.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Okuyucu B	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Toplam	33	32	71	136
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI)				128/136 (94,1) (88,8 – 97,0)

Tablo 25. Okuyucu C, VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit Uyum Oranları 3x3 Analizi–BenchMark ULTRA cihazında Clone 4B5 Boyaması.

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Okuyucu C	3+	2+	0, 1+	Toplam
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Toplam	32	25	79	136
Toplam yüzde uyumu: n/N (%) (%95 CI)				132/136 (97,1) (92,7 – 98,9)

14. **Saptama karşılaştırması çalışmaları numunelerinin patoloğlar arası tekrar edilebilirliği:**

Her bir yöntemin okuyucuları arasındaki altı olası çift karşılaştırmaları için iki taraflı skor %95 güven aralıklarıyla pozitif ve negatif uyum oranları hesaplandı.

VIEW DAB Detection Kit ile ilgili, Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için PPA oranları sırasıyla %100,0 (69/69), %98,2 (56/57), %96,5 (55/57), %93,2 (69/74), %75,7 (56/74) ve %79,7'yd (55/69). Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için NPA oranları sırasıyla %92,5 (62/67), %77,2 (61/79), %82,3 (65/79), %100,0 (62/62), %98,4 (61/62) ve %97,0'yd (65/67). Genel uyum oranı Okuyucu A ve Okuyucu B arasında en yüksek (%96,3) değerdeydi ve Okuyucu A ve Okuyucu C (%86,0) ile Okuyucu B ve Okuyucu C (%88,2) arasında daha düşük değerdeydi.

ultraView Universal DAB Detection Kit ile ilgili, Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için PPA oranları sırasıyla %96,9 (63/65), %98,2 (56/57), %98,2 (56/57), %88,7 (63/71), %78,9 (56/71) ve %86,2'yd (65/65). Okuyucu A'ya karşı B, A'ya karşı C, B'ye karşı C, B'ye karşı A, C'ye karşı A ve C'ye karşı B için NPA oranları sırasıyla %88,7 (63/71), %81,0 (64/79), %88,6 (70/79), %96,9 (63/65), %98,5 (64/65) ve %98,6'yd (70/71). Her okuyucu çifti için genel uyum oranları benzerdi ve Okuyucu A'ya karşı B, Okuyucu

A'ya karşı C ve Okuyucu B'ye karşı C için sırasıyla %92,6 (126/136), %88,2 (120/136) ve %92,6 (126/136) olarak gerçekleştirmiştir.

GASTRİK VAKALARDA PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

1. BenchMark XT cihazında çalışmalar arası tekrar edilebilirlik, 5 günlük bir dönemde (ardışık olmayan) beş çalışma halinde gerçekleştirilmiştir. 0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 ekspresyonu skorları ile üç gastrik doku vakası içeren beş slayt, her doku için pozitif/negatif değer dahilinde %100 uyum göstermiştir.
2. BenchMark XT cihazında çalışma içi tekrar edilebilirlik, 0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 ekspresyonu skorları ile üç gastrik doku vakası içeren 28 slayt üzerinde yapılmıştır. Tüm vakalar, her bir doku türü için pozitif/negatif değer dahilinde eşdeğer skorlanmıştır.
Platform içi tekrar edilebilirlik, üç BenchMark XT cihazında yapılmıştır. Bu çalışmalarda, 0, 1+, 2+ ve 3+ HER2 ekspresyonu skorları ile üç gastrik doku vakası içeren iki farklı çok dokulu bloğun her birinden alınan 30 slayt, her doku türü için pozitif/negatif değer dahilinde eşdeğer skorlanmıştır.
Platform içi tekrar edilebilirlik, üç BenchMark ULTRA cihazında test edilmiştir. Bu çalışmalarda, tek bir çok dokulu bloktan alınan 15 slaydın tümü her doku türü için pozitif/negatif değer dahilinde eşdeğer skorlanmıştır.
Platformlar arası tekrar edilebilirlik, üç BenchMark XT ve üç BenchMark ULTRA cihazında test edilmiştir. Bu çalışmalarda, tek bir çok dokulu bloktan alınan 30 slaydın tümü her doku türü için pozitif/negatif değer dahilinde eşdeğer skorlanmıştır.
3. **Gastrik Vakalar kullanılarak VIEW DAB Detection Kit ile ultraView Universal DAB Detection Kit karşılaştırması:**
VIEW DAB Detection Kit ve ultraView Universal DAB Detection Kit kullanımıyla iki cihaz (BenchMark XT cihazı ve BenchMark ULTRA cihazı) genelinde saptama kiti karşılaştırma testi yapmak için Clone 4B5 kullanılmıştır. Testin bir parçası olarak iki yüz on doku vakası kullanılmıştır. Boyanan slaytlar pozitif/negatif klinik skorlama açısından değerlendirilmiştir.
Morfoloji ve arka plan kabul edilebilirlik oranları, hem saptama kitleri hem de cihazlar için %100 bulunmuştur. Saptama kitleri arasında pozitif ve negatif klinik değerlendirmeye ilişkin doğrudan karşılaştırmalar, aşağıdaki tablolarda her bir cihaz için sunulmaktadır.

Tablo 26. BenchMark XT Cihazında ultraView Universal DAB Detection Kit ile VIEW DAB Detection Kit klinik değerlendirmesi.

ultraView Universal DAB Detection Kit	VIEW DAB Detection Kit		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	21	0	21
Negatif	0	189	189
Toplam	21	189	210
	n/N	%	
Pozitif yüzde uyumu	21/21	100	
Negatif yüzde uyumu	189/189	100	
Toplam yüzde uyumu	210/210	100	

Tablo 27. ultraView Universal DAB Detection Kit kullanımıyla BenchMark XT ve BenchMark ULTRA boyama platformlarında klinik değerlendirme karşılaştırması

BenchMark XT Boyama Platformu ile birlikte ultraView Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA Boyama Platformu ile birlikte ultraView Universal DAB Detection Kit		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	20	1	21
Negatif	0	189	189
Toplam	20	190	210
	n/N	% (%95 CI)	
Pozitif yüzde uyumu	20/20	100 (83,9-100)	
Negatif yüzde uyumu	189/190	99,5 (97,1-99,9)	
Toplam yüzde uyumu	209/210	99,5 (97,4-99,9)	

4. İnsan Gastrik Kanseriinde Clone 4B5 ile HercepTest Karşılaştırması:

Clone 4B5'in BenchMark XT cihazındaki boyama performansını Dako HercepTest ile karşılaştırmak için körleştirilmiş bir harici çalışma yürütülmüştür. Çalışma için yaklaşık 239 gastrik kanser vakasının yanı sıra Herceptin ile tedavi edilen hastalarda HER2 durumunun ve klinik sonuçların araştırıldığı ToGA çalışmasından 159 TARGOS laboratuvarı vakası test edilmiştir. Laboratuvar vakaları Clone 4B5 ve HercepTest ile boyanmıştır. Bir patolojik vakaları 0/1+, 2+ ve 3+ ölçeğinde skorlanmıştır. Pozitif vakalar 2+ ve 3+ skorlarından oluşurken, negatif vakalar 0 ve 1+ skorlarına sahiptir.

Tablo 28 ve 29'te, Clone 4B5 ile HercepTest arasındaki uyum oranları doku kaynağına göre ayrılmış olarak verilmektedir. Tablo 28'te pozitif ile negatif sonuçlar karşılaştırılırken, Tablo 29'te 0/1+, 2+ ve 3+ skorlarından oluşan 3 kategorili bir IHC ölçeği kullanılmaktadır. Tablo 28 ve 29'te tüm dokular için genel uyum sırasıyla %91,0 ve %95,3'tür.

Tablo 28. Clone 4B5 (IHC) ile HercepTest için doku kaynağına göre ayrılmış olarak Yüzde Uyum Oranları ve %95 CI. Her iki IHC testi de pozitif ile negatif karşılaştırma (0/1+ ile 2+/3+) olarak skorlandırılmıştır.

n	Toplam Yüzde Uyum (%95 CI)	n	Pozitif Yüzde Uyum (%95 CI)	n	Negatif Yüzde Uyum (%95 CI)
362/398	91,0 (87,7 – 93,4)	46/56	82,1 (70,2 – 90,0)	316/342	92,4 (89,1 – 94,8)

Tablo 29. Clone 4B5 (IHC) ile HercepTest için doku kaynağına göre ayrılmış olarak Toplam Yüzde Uyum ve %95 CI. IHC testleri 0/1+, 2+ veya 3+ olarak skorlanmıştır.

Doku Kaynağı	n	Toplam Yüzde Uyum (%95 CI)
TMA ve ToGA	355/398	89,2 (85,8 – 91,9)

5. Clone 4B5'in laboratuvarlar arası tekrar edilebilirliği: Çalışma üç test merkezinde yürütülmüştür. Çalışmaya dahil edilmek üzere numuneler, yaklaşık olarak eşit sayıda pozitif (3+) ve negatif (0, 1+) vaka olacak şekilde Clone 4B5 IHC klinik skoruna göre seçilmiştir. Ayrıca, dört vakaya kadar 2+ olarak nitelendirilen gastrik kanser vakası incelenmiştir.

Üç merkezin her birinde bir BenchMark XT platformu ve bir BenchMark ULTRA platformu kullanılarak platform başına dört boyama çalışması yürütülmüştür. Vakaları, her çalışmanın gastrik kanserde HER2 için tüm skor kategorilerini temsil eden vakaları içereceği şekilde atayan bir stratifiye edilmiş randomizasyon prosedürünün kullanımıyla, vakalar boyanmak üzere randomize edilmiştir. Her merkezdeki her bir cihazdaki çalışmalar aynı vakaları içermiştir. Her merkezde, her vakadan bir slayt Clone 4B5 ile boyanmış ve aynı vakadan bir diğer slayt da CONFIRM Negative Control Rabbit Ig ile boyanmıştır (BenchMark ULTRA

platformunda). Aynı vakadan ikinci bir slayt çifti, her bir merkezde BenchMark XT platformunda benzer şekilde boyanmıştır. Vaka slaytları, her bir merkezde, tek tek numunelere ait önceden belirlenmiş IHC klinik skorlarına karşı karşılaştırılmış bir uzman okuyucu tarafından skorlanmıştır.

Merkezler arası üç karşılaştırmanın üçü için de tüm değerlendirilebilir vakalara ilişkin genel uyum, hem BenchMark ULTRA platformunda hem de BenchMark XT platformunda %100 bulunmuştur. Değerlendirilebilir vakalar için BenchMark ULTRA platformu ile BenchMark XT platformu arasındaki genel uyum üç merkez için her birinde %100 bulunmuştur. Tüm vakalara ilişkin arka plan ve morfoloji kabul edilebilirlik oranları, Merkez A ve C'deki her iki platform için %100 ve Merkez B'deki her iki platform için de >%95 bulunmuştur. Aşağıdaki tablolara bakın.

Tablo 30. Merkezler Arasında Genel Klinik Değerlendirme Uyum: Tüm Değerlendirilebilir Vakalar.

BenchMark ULTRA cihazı	Genel Uyum Yüzdesi
Merkez A – Merkez B: n/N (%) (%95 CI)	30/30 (%100) (88,6 – 100)
Merkez A – Merkez C: n/N (%) (%95 CI)	30/30 (%100) (88,6 – 100)
Merkez B – Merkez C: n/N (%) (%95 CI)	30/30 (%100) (88,6 – 100)
BenchMark XT cihazı	Genel Uyum Yüzdesi
Merkez A – Merkez B: n/N (%) (%95 CI)	31/31 (%100) (89,0 – 100,0)
Merkez A – Merkez C: n/N (%) (%95 CI)	31/31 (%100) (89,0 – 100,0)
Merkez B – Merkez C: n/N (%) (%95 CI)	31/31 (%100) (89,0 – 100,0)

Tablo 31. Platformlar Arasında Genel Klinik Değerlendirme Uyum: Tüm Değerlendirilebilir Vakalar.

BenchMark ULTRA cihazına karşı BenchMark XT cihazı	Genel Uyum Yüzdesi
Merkez A: n/N (%) (%95 CI)	40/40 (%100) (91,2 – 100)
Merkez B: n/N (%) (%95 CI)	34/34 (%100) (89,8 – 100)
Merkez C: n/N (%) (%95 CI)	32/32 (%100) (89,3 – 100)

Tablo 32. Arka Plan Boyama ve Morfoloji Kabul Edilebilirlik Oranları: Tüm Vakalar.

BenchMark ULTRA cihazı	Tesis A	Tesis B	Tesis C
Morfoloji Kabul Edilebilirlik Oranları	44/44 (%100)	43/44 (%97,7)	44/44 (%100)
Arka Plan Kabul Edilebilirlik Oranları	44/44 (%100)	42/44 (%95,5)	44/44 (%100)
BenchMark XT cihazı	Tesis A	Tesis B	Tesis C
Morfoloji Kabul Edilebilirlik Oranları	44/44 (%100)	43/44 (%97,7)	44/44 (%100)
Arka Plan Kabul Edilebilirlik Oranları	44/44 (%100)	43/44 (%97,7)	44/44 (%100)

- BenchMarkboyama platformunu ve BenchMark GX boyama platformunu BenchMark XT boyama platformu ile karşılaştırma çalışması: FFPE gastrik karsinom vakaları içeren 3 TMA'nın kesik slaytları [TMA başına yaklaşık 50 vaka] *ultraView Universal DAB Detection Kit* ve *VIEW DAB Detection Kit* ile ilgili olarak önerilen boyama protokollerinin kullanımıyla bir BenchMark XT cihazında, BenchMark cihazında ve BenchMark GX cihazında boyanmıştır. Kontroller PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides'i ve negatif Ig reaktif ile boyanmış her TMA'nın ikinci bir slaytını içeriyordu. Boyanan slaytlar tek bir okuyucu (patolog) tarafından skorlanmıştır.

Klinik değerlendirmeye (pozitif, negatif) göre Clone 4B5 antikor boyama işlemi için genel uyum oranları (ve çift taraflı %95 güven aralıklarının alt sınırı) şöyledir: BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) %98,0 (94,2 – 99,3), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) %97,4 (93,6 – 99,0), BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*VIEW DAB Detection Kit* ile) %96,6 (92,7 – 98,4), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*VIEW DAB Detection Kit* ile) %95,9 (91,8 – 98,0).

Klinik değerlendirmeye (pozitif, negatif) göre Clone 4B5 antikor boyama işlemi için pozitif uyum oranları (ve çift taraflı %95 güven aralıklarının alt sınırı) şöyledir: BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) %91,7 (84,4 – 98,5), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) %78,6 (52,4 – 92,4), BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*VIEW DAB Detection Kit* ile) %80,0 (54,8 – 93,0), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı (*VIEW DAB Detection Kit* ile) %73,3 (48,0 – 89,1).

Klinik değerlendirmeye (pozitif, negatif) göre Clone 4B5 boyama işlemi için negatif uyum oranları (ve çift taraflı %95 güven aralıklarının alt sınırı) şöyledir: BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı *ultraView Universal DAB Detection Kit* ile %98,5 (94,8 – 99,6), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı *ultraView Universal DAB Detection Kit* ile %99,3 (96,1 – 99,9), BenchMark cihazına karşı BenchMark XT cihazı *VIEW DAB Detection Kit* ile %98,1 (94,6 – 99,4), BenchMark GX cihazına karşı BenchMark XT cihazı *VIEW DAB Detection Kit* ile %98,1 (94,5 – 99,3). Klinik değerlendirmeye (pozitif, negatif) göre her bir karşılaştırma için uyum oranlarının 2x2 sunumu aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir.

Tablo 33. BenchMark cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) 2x2 Analizi.

Clone 4B5 ile birlikte <i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
BenchMark cihazı	BenchMark XT cihazı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	11	2	13
Negatif	1	133	134
Toplam	12	135	147
	n/N	% (%95 CI)	
Toplam yüzde uyumu	144/147	%98,0 (94,2 – 99,3)	
Pozitif yüzde uyumu	11/12	%91,7 (84,6 – 98,5)	
Negatif yüzde uyumu	133/135	%98,5 (94,8 – 99,6)	

Tablo 34. BenchMark GX cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları (*ultraView Universal DAB Detection Kit* ile) 2x2 Analizi.

Clone 4B5 ile birlikte <i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
BenchMark GX cihazı	BenchMark XT cihazı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	11	1	12
Negatif	3	140	143
Toplam	14	141	155
	n/N	% (%95 CI)	
Toplam yüzde uyumu	151/155	%97,4 (93,6 – 99,0)	
Pozitif yüzde uyumu	11/14	%78,6 (52,4 – 92,4)	
Negatif yüzde uyumu	140/141	%99,3 (96,1 – 99,9)	

Tablo 35. BenchMark cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları (VIEW DAB Detection Kit ile) 2x2 Analizi.

Clone 4B5 ile birlikte VIEW DAB Detection Kit			
BenchMark cihazı	BenchMark XT cihazı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	12	3	15
Negatif	3	156	159
Toplam	15	159	174
	n/N	% (%95 CI)	
Toplam yüzde uyumu	168/174	%96,6 (92,7 – 98,4)	
Pozitif yüzde uyumu	12/15	%80,0 (54,8 – 93,0)	
Negatif yüzde uyumu	156/159	%98,1 (94,6 – 99,4)	

Tablo 36. BenchMark GX cihazına karşılık BenchMark XT cihazı; Platformlar Arası Uyum Oranları (VIEW DAB Detection Kit ile) 2x2 Analizi.

Clone 4B5 ile birlikte VIEW DAB Detection Kit			
BenchMark GX cihazı	BenchMark XT cihazı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	11	3	14
Negatif	4	154	158
Toplam	15	157	172
	n/N	% (%95 CI)	
Toplam yüzde uyumu	165/172	%95,9 (91,8 – 98,0)	
Pozitif yüzde uyumu	11/15	%73,3 (48,0 – 89,1)	
Negatif yüzde uyumu	154/157	%98,1 (94,5 – 99,3)	

Tablo 37. Tüm Değerlendirilebilir HER2 Denekleri için HER2 Durumıyla İlgili Clone 4B5 ve Dako Testleri Uyum Değerlendirilebilir IHC Deneklerinin Clone 4B5 ve kayıt IHC testi ile belirlenen Pozitif veya Negatif HER2 durumu söz konusudur.

Çalışma	Clone 4B5 Skoru [b]	DAKO HER2 Durumu [a] [b]		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Perjeta ve Kadcylla	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Toplam	2558	272	2830
Pozitif Yüzde Uyum (PPA) n/N (%) (%95 CI)		2380/2558 (93,0) (92,0 – 94,0)		
Negatif Yüzde Uyum (NPA) n/N (%) (%95 CI)		257/272 (94,5) (91,1 – 96,6)		
Toplam Yüzde Uyum (OPA) n/N (%) (%95 CI)		2637/2830 (93,2) (92,2 – 94,1)		

[a] Pozitif = IHC Pozitif ve/veya ISH Amplifiye. Negatif = IHC Negatif ve Amplifiye ISH değil veya ISH Amplifiye Olmamış ve IHC Pozitif değil.

[b] IHC: Pozitif = 3+; Negatif = 0, 1+ veya 2+.

Varılan Sonuç: Bu çalışmalardan elde edilen veriler, VENTANA HER2 (4B5) ürününün, meme ve gastrik neoplastik dokularını uygun şekilde boyama kabiliyeti bakımından tekrar edilebilir ve spesifik olduğunu göstermiştir. Yöntem karşılaştırma ve laboratuvarlar arası tekrar edilebilirlik verileri, VENTANA HER2 (4B5) ürününün, Herceptin tedavisinin düşünüldüğü meme ve gastrik kanseri hastalarının değerlendirilmesinde yardımcı bir araç olarak endike olduğunu kanıtlamaktadır.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ – PERJETA VE KADCYLA

HER2 Meme - Meme karsinomunda Perjeta ve Kadcylla çalışmaları Kayıt Testi İçin Yöntem Karşılaştırma Çalışması

Perjeta ve Kadcylla çalışmaları için kayıt testlerinin eşdeğerliği, çalışma numunelerinin VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Tavşan Monoklonal Primer Antikor testi ile boyanmasıyla belirlenmiştir. Perjeta çalışması için değerlendirilen 2753 numune ve Kadcylla çalışması için değerlendirilen 99 numune VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoklonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) ile boyanmıştır. Pozitif (PPA), Negatif (NPA) ve Toplam (OPA) Yüzde Uyum Oranları belirlenmiştir. %95 CI (2 taraflı %95 güven aralığı) skor yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 38. Değerlendirilebilir tüm IHC Denekleri için IHC Durumuyla İlgili Clone 4B5 ve Dako Testlerinin Uyumu. Değerlendirilebilir IHC Deneklerinin Clone 4B5 ve kayıt IHC testi ile belirlenen Pozitif veya Negatif HER2 durumu söz konusudur.

Çalışma	Clone 4B5 Durumu [a]	Dako HercepTest Durumu [a]		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Perjeta ve Kadcylla	Pozitif	2330	65	2395
	Negatif	21	414	435
	Toplam	2351	479	2830
	Pozitif Yüzde Uyumu (PPA) n/N (%) (%95 CI)	2330/2351 (99,1) (98,6 – 99,4)		
	Negatif Yüzde Uyumu (NPA) n/N (%) (%95 CI)	414/479 (86,4) (83,1 – 89,2)		
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	2744/2830 (97,0) (96,3 – 97,5)		
Perjeta	Pozitif	2267	63	2330
	Negatif	10	399	409
	Toplam	2277	462	2739
	Pozitif Yüzde Uyumu (PPA) n/N (%) (%95 CI)	2267/2277 (99,6) (99,2 – 99,8)		
	Negatif Yüzde Uyumu (NPA) n/N (%) (%95 CI)	399/462 (86,4) (82,9 – 89,2)		
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	2666/2739 (97,3) (96,7 – 97,9)		
Kadcylla	Pozitif	63	2	65
	Negatif	11	15	26
	Toplam	74	17	91
	Pozitif Yüzde Uyumu (PPA) n/N (%) (%95 CI)	63/74 (85,1) (75,3 – 91,5)		
	Negatif Yüzde Uyumu (NPA) n/N (%) (%95 CI)	15/17 (88,2) (65,7 – 96,7)		
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	78/91 (85,7) (77,1 – 91,5)		

[a] Pozitif = 3+; Negatif = 0, 1+ veya 2+.

Tablo 39. Değerlendirilebilir tüm IHC Denekleri için IHC Skoruyla İlgili Clone 4B5 ve Dako Testlerinin Uyumu. Değerlendirilebilir IHC Deneklerinin Clone 4B5 ve kayıt IHC testi ile belirlenen Pozitif veya Negatif HER2 durumu söz konusudur.

Çalışma	Clone 4B5 Skoru	Dako HercepTest Skoru		
		3+	2+	0/1+
Perjeta ve Kadcylla	3+	2330	64	1
	2+	12	235	15
	0/1+	9	26	138
	Toplam	2351	325	154
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	2703/2830 (95,5) (94,7 – 96,2)		
Perjeta	3+	2267	62	1
	2+	9	226	13
	0/1+	1	24	136
	Toplam	2277	312	150
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	2629/2739 (96,0) (95,2 – 96,7)		
Kadcylla	3+	63	2	0
	2+	3	9	2
	0/1+	8	2	2
	Toplam	74	13	4
	Toplam Yüzde Uyumu (OPA) n/N (%) (%95 CI)	74/91 (81,3) (72,1 – 88,0)		

Tablo 40. Clone 4B5 Boyama Kabul Edilebilirliği. IHC Testi Yapılmış Denekler. Geçerli bir IHC skoru (0, 1+, 2+ veya 3+) belirlenebilirse IHC boyama kabul edilebilir olarak değerlendirilir. Kabul edilemez boyama nedenleri kabul edilemez negatif kontrol, doku kaybı, yetersiz tümör, kabul edilemez arka plan ve kabul edilemez morfolojiyi içerir.

Parametre	Perjeta	Kadcyla	Perjeta ve Kadcyla
Başlangıç IHC Testlerinin Sayısı	2753	99	2852
Başlangıç Boyama Kabul Edilebilirliği n/N (%) (%95 CI)	2708/2753 (98,4) (97,8, 98,8)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2800/2852 (98,2) (97,6, 98,6)
IHC Tekrar Testlerinin Sayısı	40	0	40
Nihai Boyama Kabul Edilebilirliği n/N (%) (%95 CI)	2746/2753 (99,7) (99,5, 99,9)	92/99 (92,9) (86,1, 96,5)	2838/2852 (99,5) (99,2, 99,7)

SORUN GİDERME

1. Pozitif kontrol beklenenden daha yetersiz boyama gösterirse, sorunun kaynağının primer antikor mu yoksa genel sekonder reaktiflerden biri mi olduğunu belirlemek için aynı anda çalıştırılan diğer pozitif kontroller denetlenmelidir.
2. Pozitif kontrolün negatif olması durumunda, slaydın doğru barkodu taşıyıp taşımadığı kontrol edilmelidir. Slayt uygun şekilde etiketlenmişse, aynı cihaz döngüsünde çalışılan diğer pozitif kontroller incelenmeli ve bunun primer antikordan mı yoksa ortak sekonder reaktiflerden birinden mi kaynaklandığı belirlenmelidir. Dokular yanlış bir şekilde toplanmış, fiks edilmiş veya parafinden arındırılmış olabilir. Toplama, saklama ve fiksasyon için uygun prosedür izlenmelidir.
3. Parafinin tamamı temizlenmemişse, boyama olmayabilir. Parafinden arındırma prosedürü tekrarlanmalıdır.
4. Spesifik antikor boyaması çok yoğunsa, istenen boyama yoğunluğu elde edinceye kadar inkübasyon süresi kısaltılarak çalışma tekrar edilmelidir.
5. Doku kesitleri slayttan çıkıyorsa, slaytlar kontrol edilerek pozitif yüklü olduklarından emin olunmalıdır.
6. Gastrik kansinomda tümör alanının yakın çevresindeki normal mukozada çekirdek ve sitoplazma boyanması mevcutsa ve membran boyamanın yorumlanmasında karışıklık yaratıyorsa, vaka ISH ile test edilebilir.
7. Düzeltici eylemler için, Adım Adım Prosedürler bölümüne veya cihazın Kullanıcı Kılavuzu'na bakın ya da yerel destek temsilciniz ile bağlantı kurun.

REFERANSLAR

1. Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232: 1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO*. 1987; 6: 605-610.
3. Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
4. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
5. Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
6. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69: 57-58.
7. Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*. 1997;75: 667-1673.
8. Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 1990;161:15-25.
9. Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. *Eur J Cancer*. 1993;29A:1018-1023.
10. DePottier CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.
11. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.

12. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
13. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
14. CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
15. Hoffmann M, et al. *Histopathology*. 2008;52:797-805.
16. Rüschoff J, 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.
17. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66(4):194-199.
18. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1980;73(5):626-32.
19. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
20. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
21. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization, *Mod Pathol*. 2001;14:1079-86.
22. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*. 1994;47:816-22.
23. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol*. 2003;16:173-182.
24. Rhodes A, Sarson J, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(4): 621-32.
25. van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2 status in breast cancer. *Mod Pathol*. 2009;22(7):879-886.
26. Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neu Test 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Virchows Arch*. 2009;454(3):241-8 (Epub: 24 Jan 2009).
27. Itoh H, Kato N, Serizawa A, Itoh T, Umemura S, Osamura RY. HER2 Rabbit Monoclonal Antibody 4B5 and Silver SISH: High Performance in Surgical Pathology for Appropriate Patient Care. *Laboratory Investigation*. 2009;89(1): 48A.
28. Powell WC, Roche PC, Tubbs RR. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(6):569.

29. Carbone A, Botti G, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. J Mol Diagn. 2008;10(6): 527-36.
30. Wolff AC, Hammond ME, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med. 2007;131(1):18.
31. Baselga J, Gelson KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
32. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.
33. Huvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
34. <http://www.kadcyla.com/hcp>
35. <http://www.perjeta.com/hcp>

FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView*, PATHWAY, VENTANA ve VENTANA logosu Roche şirketinin ticari markalarıdır.

Diğer tüm ticari markalar, ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

İLETİŞİM BİLGİLERİ



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com