

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

REF 790-4493

05999570001

IVD  50

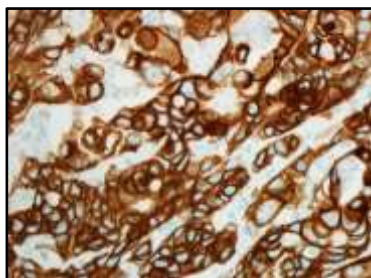


Fig. 1. VENTANA anti-HER2 (4B5) antikropp 3+-färgning av gastriskt karcinom.

AVSEDD ANVÄNDNING

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody är avsedd för semikvantitativ detektion av HER2-antigen i snitt av formalinfixerad, paraffinbäddad normal och neoplastisk bröstvävnad och gastrisk vävnad som färgats på ett BenchMark IHC/ISH-instrument.

Denna produkt är indikerad som en hjälp vid bedömning av patienter med bröstcancer och gastrisk cancer för vilka behandling med Herceptin® (trastuzumab) övervägs och för patienter med bröstcancer för vilka

behandling med KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansin) eller PERJETA® (pertuzumab) övervägs.

Denna produkt bör tolkas av en kvalificerad patolog i samband med en histologisk undersökning, relevant klinisk information och lämpliga kontroller.

Denna antikropp är avsedd för användning vid in vitro-diagnostik (IVD).

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp) är en kanin monoklonal antikropp (klon 4B5) som är riktad mot den inre domänen hos human epidermal tillväxtfaktorreceptor 2 (HER2). HER2 klonades och karakteriserades av Akiyama, et al 1986.¹ Klon 4B5 har visat sig reagera med ett 185 kD-protein från SK-BR-3-cellsat via Western blotting. SK-BR-3 är en bröstcancermodell som har ett 128-faldigt överuttryck av HER2 mRNA.² Storleken hos det identifierade bandet korrelerar väl med det som rapporterats för HER2-protein (185 kD).¹ Immunhistokemi (IHC)-experiment med transfekterade cellinjer (HEK293) har visat att klon 4B5 färgar celler som transfekterats med HER2 och celler som transfekterats med HER4. Ingen färgning av celler som transfekterats med HER1 eller HER3 observerades. Western blot-data med rekombinant HER4-protein indikerade också att klon 4B5 känner igen en HER4-epitop.

HER2 är en transmembran tyrosinkinasreceptor på cirka 185 kD som strukturellt liknar epidermal tillväxtfaktorreceptor.^{3,4} Genamplifiering och motsvarande överuttryck av HER2 har funnits i en mängd olika tumörer, inklusive bröstcancer och gastriskt karcinom.^{3,4,5} Proteinöveruttryck på grund av amplifiering av HER2-genen är den primära drivkraften för HER2-medierad tumörigenes.³ Överdrivet stort HER2-proteinuttryck vid cellmembranet förbättrar signaltransduktionen, vilket uppreglerar proliferation och differentiering och slutligen orsakar tumörbildning.^{3,4,5}

Mellan 15 och 30 % av invasiv ductal cancer är positiv för överuttryck av HER2-protein och/eller genamplifiering.^{6,7} Nästan alla fall av Pagets sjukdom i bröstet och upp till 90 % av fallen av ductalt karcinom in situ av comedo-typ är positiva.^{6,8} Överuttryck av HER2-protein och/eller genamplifiering förekommer vid adenokarcinom i gastriska och gastroesofageala förbindningen.^{9,10,11} Ett brett intervall av HER2-överuttrycksfrekvens har rapporterats i publicerade studier. En av de största screeningdatauppsättningarna som omfattade 3803 patienter med adenokarcinom i gastriska och gastroesofageala förbindningen rapporterade dock att 22 % av patienterna testade positivt för överuttryck av HER2-protein eller genamplifiering.¹²

KLINISK SIGNIFIKANS

Bröstcancer är det vanligaste karcinom som förekommer hos kvinnor och den näst största orsaken till cancerrelaterad död.^{4,6} I Nordamerika är kvinnans risk att utveckla bröstcancer en på åtta.⁴ Tidig upptäckt och lämplig behandling kan avsevärt påverka den totala överlevnaden.^{13,14} Små vävnadsprover kan enkelt användas i rutinmässig IHC, vilket gör denna teknik, i kombination med antikroppar som detekterar antigener viktiga för karcinomtolkning, till ett effektivt verktyg för patologer i deras diagnos och prognos för sjukdom. En viktig markör för bröstcancer idag är onkoproteinet HER2.¹⁵⁻¹⁸ Läkemedlen Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) och KADCYLA (ado-trastuzumab emtansin/trastuzumab emtansin) har visat sig gynna vissa patienter med bröstcancer genom att stoppa, och i vissa fall tillbakabilda tillväxten av deras cancer.¹⁵⁻¹⁹

Läkemedlet är humaniserade monoklonala antikroppar som binder till HER2-protein i cancerceller.^{7,15,18,19} In vitro-diagnostik för bedömning av HER2-status hos bröstcancerpatienter är viktigt för att hjälpa kliniker till beslut om HER2-riktad behandling.¹⁵⁻¹⁸ IHC-baserad detektion av HER2-proteinuttryck används som en hjälp vid bedömning av bröstcancerpatienter för vilka HER2-riktad behandling Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) eller KADCYLA (trastuzumab emtansin) övervägs.

Gastrisk cancer är den femte vanligaste cancerformen och en ledande orsak till cancerrelaterade dödsfall världen över.¹⁰ Kirurgi är den vanligaste behandlingen vid gastrisk cancer.^{11,20} De flesta fall av gastrisk cancer upptäcks dock i ett framskridet skede och ingreppet är ofta svårt att utföra.^{11,20} Kemoterapi används för att behandla framskriden gastrisk cancer även om överlevnaden för cancerpatienterna är mycket låg.^{11,20} Den HER2-riktade trastuzumabbehandlingen är en grundpelare i hanteringen av invasivt bröstcancer och har terapeutiskt värde vid hanteringen av patienter med gastrisk cancer som överuttrycker receptorn.^{9,11} Demonstration av HER2 genamplifiering och/eller proteinöveruttryck är viktigt för att välja patienter för trastuzumabbehandling.^{9,11} Kliniska studier har visat att patienter med bröstcancer eller gastrisk cancer med högt HER2-proteinöveruttryck och/eller genamplifiering har störst nytta av trastuzumab.⁹ IHC-baserad detektion av HER2-proteinuttryck används som en hjälp vid bedömning av patienter med gastrisk cancer för vilka behandling med Herceptin (trastuzumab) övervägs. Tolkning av resultaten av alla detektionssystem för HER2 måste ta hänsyn till det faktum att HER2 uttrycks i både bröstcancer och tumörer med gastrisk cancer och frisk vävnad, om än på olika nivåer och med olika uttrycksmönster.^{10,21} Histologiska vävnadspreparat har fördelen att de har intakt vävnadsmorfologi vilket underlättar tolkningen av HER2-positivitet i provet.

PRINCIPER FÖR PROCEDUREN

VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppen är en kanin monoklonal antikropp som binder till HER2 i formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnadssnitt. Den specifika antikroppen kan lokaliseras genom antingen en biotinkonjugerad sekundär antikropsformulering som känner igen kaninimmunoglobuliner följt av tillsats av ett streptavidin-horseradish peroxidas (HRP-) konjugat (VIEW DAB Detection Kit) eller ett sekundärantikropp-HRP-konjugat (ultraView Universal DAB Detection Kit). Det specifika antikropp-enzymkomplexet visualiseras sedan med en enzymreaktionsprodukt som fälls ut. Varje steg inkuberas under en exakt tid och temperatur. I slutet av respektive inkubationssteg tvättas instrumentet av dessa snitt för att stoppa reaktionen och för att avlägsna obundet material som skulle kunna hindra önskad reaktion i efterföljande steg. Instrumentet applicerar också flytande täckglas, vilket minimerar avdunstningen av de vattenhaltiga reagensen från objektglaset.

Kliniska fall bör utvärderas inom ramen för hur lämpliga kontroller presterar. Inkludering av en positiv vävnadskontroll, fixerad och bearbetad på samma sätt som patientprovet rekommenderas (till exempel ett svagt positivt bröstcancer eller gastriskt karcinom). Förutom att färga med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp, ska ett andra objektglas färgas med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. För att testet ska anses giltigt bör den positiva kontrollvävnaden uppvisa membranfärgning av tumörceller. Dessa komponenter bör vara negativa när de färgas med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Dessutom rekommenderas att ett negativt vävnadskontrollobjektglas (till exempel ett HER2-negativt bröstcancer eller gastriskt karcinom) inkluderas för varje uppsättning prover som bearbetas och körs på ett BenchMark IHC/ISH-instrument. Denna negativa vävnadskontroll bör färgas med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp för att säkerställa att antigenförstärkningen och andra förbehandlingsprocedurer inte skapar falsk positiv färgning.

MEDFÖLJANDE MATERIAL

VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppen innehåller tillräckligt med reagens för 50 tester.

En 5 mL dispenser VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp innehåller ca 30 µg kanin monoklonal antikropp riktad mot humant HER2-antigen.

Antikroppen späds i 0.05 M Tris-buffrad saltlösning, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 med 0.3 % bärarprotein och 0.05 % natriumazid, ett konserveringsmedel. Det finns spår av fetalt kalvserum, ungefär 0.25 % närvarande från stamlösningen.

Specifik antikropps-koncentration är ca 6 µg/mL. VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp är en kanin-IgG utspädd från vävnadsodlings-supernatant.

Se metodblad för respektive detektionskit från VENTANA för detaljerad beskrivning av: Principer för proceduren, Material och metoder, Provinsamling och beredning för analys, Procedurer för kvalitetskontroll, Felsökning, Tolkning av resultaten och Begränsningar.

NÖDVÄNDIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER

Färgningsreagens som VENTANA-detektionskit och tillhörande komponenter, inklusive objektglas med negativa och positiva vävnadskontroller, medföljer inte.

Eventuellt är inte alla produkter i metodbladet tillgängliga i alla länder. Rådfråga din lokala supportrepresentant.

Följande reagenser och material kan behövas vid färgning men medföljer ej:

1. Rekommenderad kontrollvävnad
2. Objektglas för mikroskop, positivt laddade
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. nr 790-4795 / 06683380001)
4. *ultraView* DAB Detection Kit (kat. nr 760-500 / 05269806001)
5. *VIEW* DAB Detection Kit (kat. nr 760-091 / 05266157001 (50 tester))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. nr 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. nr 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (kat. nr 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (kat. nr 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. nr 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. nr 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (kat. nr 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (kat. nr 760-2037 / 05266769001)
14. Laboratorieutrustning för allmänt bruk
15. BenchMark IHC/ISH-instrument

FÖRVARING OCH STABILITET

Förvaras i 2–8 °C vid mottagandet och när den inte används. Får ej frysas.

För att garantera korrekt reagenstillförsel och antikroppens stabilitet måste locket på dispensern sättas på igen efter varje användning, och dispensern omedelbart placeras i kylskåp i upprätt läge.

Varje antikroppsdispenser är märkt med utgångsdatum. Vid korrekt förvaring är reagenset stabilt fram till det datum som anges på etiketten. Använd inte reagenset efter detta utgångsdatum.

PROVBEREDNING

Rutinmässigt bearbetade FFPE-vävnader lämpar sig för användning med denna primärantikropp när de används med VENTANA-detektionskit och BenchMark IHC/ISH-instrument. Rekommenderat vävnadsfixeringsmedel är 10 % neutralbuffrad formalin.²² Objektglasen bör färgas omedelbart, eftersom antigenicitet i vävnadssnitt kan avta med tiden.

Det rekommenderas att positiva och negativa kontroller körs samtidigt som okända prover.

Cirka 4 µm tjocka snitt bör skäras och plockas upp på objektglas. Objektglasen ska vara Superfrost Plus eller motsvarande. Studier indikerar att lufttorkad, snittad vävnad och cellinjesnitt som förvaras vid 2–8 °C är stabila i upp till 6 månader. Varje laboratorium bör validera objektglasets stabilitet för sina egna procedurer och förvaringsförhållanden.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För användning vid in vitro-diagnostik (IVD).
2. Endast för yrkesmässigt bruk.
3. **FÖRSIKTIGHET:** Enligt federal lag i USA får enheten endast säljas av läkare, eller enligt läkares ordination. (Rx Only)
4. Använd inte fler gånger än det angivna antalet tester.
5. Positivt laddade objektglas kan vara känsliga för miljöpåverkan vilket kan leda till felaktig färgning. Be din servicerepresentant från Roche om mer information om hur denna typ av objektglas ska användas.

6. Användningen av denna produkt för urval av patienter som är lämpade för behandling med KADCYLA eller PERJETA kanske inte är möjlig i alla länder. Rådfråga din lokala Roche-representant för att kontrollera tillgängligheten på särskilda platser.
7. Material av humant eller animaliskt ursprung ska hanteras som biologiskt farligt avfall och omhändertas i enlighet med tillämpliga försiktighetsåtgärder. Vid exponering ska de ansvariga myndigheternas hälsodirektiv följas.^{23,24}
8. Undvik att reagenser kommer i kontakt med ögon och slemhinnor. Om reagenser kommer i kontakt med känsliga områden ska dessa sköljas med stora mängder vatten.
9. Undvik mikrobiell kontaminering av reagenser eftersom det kan orsaka felaktiga resultat.
10. Vid användning enligt instruktionerna klassificeras inte denna produkt som ett farligt ämne. Konserveringsmedlet i reagenset är natriumazid. Symtom på överexponering för natriumazid inkluderar hud- och ögonirritation och irritation av slemhinnor och övre luftvägar. Koncentrationen av natriumazid i denna produkt är 0.05 % och uppfyller inte kriterierna för ett farligt ämne. Uppbyggnad av NaN₃ kan reagera med bly- och kopparrör för att bilda mycket explosiva metallazider. Vid kassering, spola med stora volymer vatten för att förhindra azidansamling i rören.²⁵ Systemiska allergiska reaktioner är möjliga hos känsliga individer.
11. För ytterligare information om användningen av den här enheten, se användarhandboken för BenchMark IHC/ISH-instrumentet och bruksanvisningarna för alla nödvändiga komponenter på dialog.roche.com.
12. Kontakta lokala och/eller statliga myndigheter angående rekommenderad metod för avfallshantering.
13. Produktsäkerhetsmärkningsen följer främst EU:s GHS-vägledning. Säkerhetsdatablad finns tillgängligt för professionella användare på begäran.
14. För att rapportera misstänkta allvarliga händelser relaterade till den här enheten ska man kontakta den lokala Roche-representanten och den behöriga myndigheten i den medlemsstat eller land där användaren är etablerad.

FÄRGNINGSPROCEDUR

VENTANA primärantikroppar har utvecklats för användning på BenchMark IHC/ISH-instrument i kombination med VENTANA-detektionskit och tillbehör. Se tabellerna nedan för rekommenderade färgningsprotokoll.

Denna antikropp har optimerats för specifika inkubationstider, men användaren måste validera resultat som erhålls med detta reagens.

Parametrarna för de automatiserade procedurerna kan visas, skrivas ut och redigeras i enlighet med metoden i instrumentets användarhandbok. Se lämpligt metodblad för VENTANA-detektionskit för ytterligare information om immunhistokemiska färgningsprocedurer.

Mer information om korrekt användning av denna enhet finns i metodblad för inline dispenser som är associerat med art.nr 790-4493.

Tab. 1. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp med *VIEW* DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrument.

Procedurtyp	Metod		
	GX	XT	ULTRA
Avparaffinering	Vald	Vald	Vald
Cellkonditionering (antigendemaskering)	CC1, Standard	CC1, Standard	ULTRA CC1, Mild
Antikropp (primär)	32 minuter, 37 °C	32 minuter, 37 °C	24 minuter, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	Ej vald	Vald	Vald
Kontrastfärg	Hematoxylin II, 4 minuter		
Efter kontrastfärg	Bluing, 4 minuter		

Tab. 2. Rekommenderat färgningsprotokoll för VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp med *ultraView* Universal DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrument.

Procedurtyp	Metod		
	GX	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Avparaffinering	Vald	Vald	Vald
Cellkonditionering (Antigendemaskering)	CC1, Mild	CC1, Mild	ULTRA CC1, Mild
Antikropp (primär)	16 minuter, 37 °C	16 minuter, 37 °C	12 minuter, 36 °C
ultraWash	Vald		
Kontrastfärg	Hematoxylin II, 4 minuter		
Efter kontrastfärg	Bluing, 4 minuter		

På grund av variationer i vävnadsfixering och -bearbetning samt generella laboratorieinstrument och omgivningsförhållanden, kan man behöva öka eller minska inkubationen med primärantikroppen eller cellkonditionering, baserat på individuella prover, den detektion som används och avläsarens preferens. Ytterligare information om fixeringsvariabler finns i "Immunohistochemistry Principles and Advances".²⁶

Tab. 3 Anges de rekommenderade färgningsprocedurerna för bröstcancer och gastrisk cancer.

Tab. 3. Färgningsprocedurer på BenchMark IHC/ISH-instrument.

	GX	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Bröstcancer	VIEW DAB- eller <i>ultraView</i> DAB-färgningsprocedur*	VIEW DAB- eller <i>ultraView</i> DAB-färgningsprocedur*	VIEW DAB- eller <i>ultraView</i> DAB-färgningsprocedur*
Gastrisk cancer	GX uVDAB HER2 4B5 gastrisk (Tab. 2)	XT uVDAB HER2 4B5 gastrisk (Tab. 2)	ULTRA uVDAB HER2 4B5 gastrisk (Tab. 2)

* Prover av bröstcancer färgade på BenchMark IHC/ISH-instrument använder färgningsprocedurerna för VIEW DAB Detection Kit (Tab. 1) eller *ultraView* Universal DAB Detection Kit (Tab. 2)

PROCEDURER FÖR KVALITETSKONTROLL

Cellinjesystemkontroll

Ventana har som separat produkt fyra formalinfixerade paraffinbäddade cellinjekontroller, snittade och placerade på ett enda laddat objektglas. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (art.nr 781-2991) kan vara användbara för preliminär validering av processmetoden som används för färgning av objektglas med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp. Dessa fyra cellinjekontroller karakteriseras av in situ-hybridisering för genkopieringsnummer, Tabell 4. När de bearbetas och färgas på lämpligt sätt bör cellinjerna färgas enligt beskrivningen i metodbladet för PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Om den angivna färgningen inte syns i lämpliga snitt, särskilt kontrollerna 1+ och 2+, bör färgningen av vävnaderna upprepas.

Tab. 4. Egenskaper hos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

HER2 IHC-resultat	Cellinje	HER2/Chr17-förhållande*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* HER2/Chr17-förhållandet är ett genomsnitt av tre loter PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides bestämda med hjälp av fluorescens in situ-hybridisering (FISH).

POSITIV VÄVNADSKONTROLL

Positiv kontrollvävnad fixerad och bearbetad på samma sätt som patientproverna måste köras för varje uppsättning testförhållanden och med varje VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppsfärgningsprocedur som utförs. Optimal laboratoriepraxis använder ett positivt kontrollsnitt på samma objektglas som testvävnad. Detta bidrar till att identifiera eventuella fel som gäller för reagenserna i objektglaset. Vävnad med svag positiv färgning är mer lämpad för optimal kvalitetskontroll. Kontrollvävnad kan innehålla både positiva och negativa färgningselement och fungera som både positiv och negativ kontroll. Kontrollvävnad bör utgöras av färsk obduktions-, biopsi- eller kirurgiska prover, vilka preparerats eller fixerats så tidigt som möjligt på ett sätt som är identiskt med behandlingen av testsnitten.

Sådan vävnad kan utgöra kontroll för alla steg i analysen, från vävnadsberedning till färgning. Användning av ett vävnadssnitt som är fixerat eller bearbetat på ett annat sätt än testprovet utgör kontroll för alla reagens- och metodsteg utom fixering och vävnadsberedningen. Helst bör vävnad, som är känd för att ha svag men positiv färgning, väljas för att säkerställa att systemet är känsligt för små mängder reagensnedbrytning eller problem med IHC-metoden. I allmänhet är dock neoplastisk vävnad som är positiv för HER2 starkt positiv på grund av patologins natur (överuttryck).

Kända positiva vävnadskontroller bör endast användas för att övervaka korrekt prestanda för reagenser och instrument, inte som hjälpmedel vid fastställande av en specifik diagnos för testprov. Om de positiva vävnadskontrollerna inte uppvisar positiv färgning, bör testprovets resultat anses ogiltiga.

Ett exempel på en positiv kontroll för VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp är ett känt svagt HER2-positivt invasivt bröstcancer eller ett känt svagt positivt prov av gastrisk cancer. De positivt färgade vävnadskomponenterna (membranfärgning av neoplastiska celler) används för att bekräfta att antikroppen applicerades och instrumentet fungerade korrekt.

Negativ vävnadskontroll

Samma objektglas som används för den positiva vävnadskontrollen (duktalt eller lobulärt invasivt bröstcancer eller gastrisk cancer) kan användas som negativ vävnadskontroll. De icke-färgande komponenterna (omgivande stroma, lymfoidceller och blodkärl) bör visa frånvaro av specifik färgning och ge en indikation på specifik bakgrunds-färgning (falskt positiv) med primärantikroppen. Använd en känd negativ vävnad som fixerats, behandlats och bäddats in på exakt samma sätt som patientprovet (-proverna).

Negativ reagenskontroll

En negativ reagenskontroll måste köras för varje prov för att underlätta tolkningen av resultaten. En negativ reagenskontroll används i stället för primärantikroppen för att utvärdera icke-specifik färgning. Objektglaset bör vara färgat med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubationsperioden för den negativa reagenskontrollen bör vara samma som primärantikroppens inkubationsperiod.

Oförklarliga avvikelser

Oförklarliga avvikelser i kontrollerna bör omedelbart rapporteras till din lokala supportrepresentant. Om kvalitetskontrollresultaten inte uppfyller specifikationerna är patientresultaten ogiltiga. Se felsökningsavsnittet. Identifiera och åtgärda problemet och upprepa sedan patientproverna.

Analysverifiering

Före den första användningen av en antikropp eller ett färgningssystem i en diagnostisk procedur bör antikroppens specificitet verifieras genom att testa den på en serie vävnader med kända immunhistokemiska prestandaegenskaper som representerar kända positiva och negativa vävnader (se avsnittet Procedurer för kvalitetskontroll tidigare beskrivs i detta avsnitt av produktinformationen och rekommendationerna för kvalitetskontroll från College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²⁷ eller CLSI Approved Guideline²⁸ eller båda dokumenten). Dessa procedurer för kvalitetskontroll bör upprepas för varje ny antikroppslot eller när det finns förändringar i analysparametrarna. Vävnad med bröstcancer och gastrisk cancer med känd HER2-status är lämplig för analysverifiering.

TOLKNING AV FÄRGNINGRESULTAT / FÖRVÄNTADE RESULTAT

VENTANA-automatiserad immunfärgningsprocedur gör att en brunfärgad (DAB) reaktionsprodukt fälls ut vid antigenplatserna lokalisera av VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp. En kvalificerad patolog med erfarenhet av immunhistokemiska procedurer måste utvärdera kontrollerna och kvalificera den färgade produkten innan resultaten tolkas.

Positiva kontroller

Den färgade positiva vävnadskontrollen bör undersökas först för att säkerställa att alla reagenser fungerar korrekt. Förekomsten av en lämpligt färgad reaktionsprodukt i membranet hos målcellerna är en indikation på positiv reaktivitet. Beroende på inkubationslängden och styrkan hos det använda hematoxylinet kommer kontrastfärgning att resultera i en blek till mörkblå färgning av cellkärnor. Överdriven eller ofullständig kontrastfärgning kan leda till felaktig tolkning av resultaten.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning, bör alla testprovernas resultat anses ogiltiga.

Negativa vävnadskontroller

Den negativa vävnadskontrollen bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att verifiera den specifika märkningen av målantigenet med primärantikroppen. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar avsaknad av korsreaktivitet för antikropp för celler eller cellulära komponenter. Om vävnaden är kontrastfärgad kan det finnas fläckar runt utsidan av cellen, dvs de interstitiella utrymmena. Om specifik färgning inträffar på den negativa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientproverna betraktas som ogiltiga.

Negativa reagenskontroller

Icke-specifik färgning, om sådan förekommer, kommer att ha ett diffust utseende. Sporadisk ljus färgning av bindväv kan också observeras i vävnadssnitt som är alltför formalinfixerade. Intakta celler ska användas för tolkning av färgningsresultaten, eftersom nekrotiska eller degenererade celler ofta färgas ospecifikt.

Patientvävnad

Patientprover ska undersökas sist. Positiv färgningsintensitet bör bedömas inom ramen för eventuell bakgrundsfärgning av den negativa reagenskontrollen. Som med alla immunhistokemiska test betyder ett negativt resultat att antigenet i fråga inte detekterades, inte att antigenet inte fanns i cellerna eller analyserad vävnad. Morfologin för varje vävnadsprov bör också undersökas med hjälp av en hematoxylin- och eosinfärgade snitt vid tolkning av eventuella immunhistokemiska resultat. Patientens morfologiska resultat och relevanta kliniska data måste tolkas av en kvalificerad patolog.

En kvalificerad patolog med erfarenhet av immunhistokemiska procedurer måste utvärdera positiva och negativa kontroller och kvalificera den färgade produkten innan resultaten tolkas.

Värderingskonventioner för tolkning av VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp vid bröstcancer

Bröstcancer som anses vara positiva för HER2-proteinöveruttryck måste uppfylla tröskelkriterierna för färgningsintensitet (2+ eller större på en skala från 0 till 3+) och procentpositiva tumörceller (större än 10 %). Färgning måste även lokaliseras till cellmembranet. Cytoplasmisk färgning kan fortfarande vara närvarande, men denna färgning ingår inte i bestämningen av positivitet. Skanna hela vävnadssnittet för att säkerställa att värdet endast räknas i välbevarade och välfärgade områden. Färgning som helt omsluter det cytoplasmiska membranet bör värderas som intensiteten "2+" eller "3+". Partiell färgning av membranet bör värderas som "1+". Det kan vara nödvändigt att undersöka gränssfall vid 40X eller högre förstoring för att skilja mellan intensiteten "1+" och "2+". Till skillnad från fall som värderas som en intensitet av 3+, har färgningen som fått 2+ en skarp och tydligare avgränsad ring, medan fall med 3+ uppvisar en mycket tjock kontur. Nedan visas ett snabbreferensdiagram för färgningskriterier. Se *Tolkningssguide för VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Staining of Breast and Gastric Carcinoma* (art.nr 1012716) för en mer detaljerad beskrivning med fotografier av färgning med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp.

Tab. 5. Kriterier för intensitet och mönster av cellmembranfärgning med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp vid bröstcancer.

Färgningsmönster	Värde (rapport till behandlande läkare)	Bedömning av HER2-färgning
Ingen membranfärgning observerad	0	Negativt
Svag, partiell färgning av membranet i någon del av cancercellerna	1+	Negativt

Färgningsmönster	Värde (rapport till behandlande läkare)	Bedömning av HER2-färgning
Svag till måttlig fullständig färgning av membranet, > 10 % av cancercellerna	2+	Tvetydig*
Intensiv fullständig färgning av membranet, > 10 % av cancercellerna	3+	Positivt

* Rekommenderad reflex till ISH

Värderingskonventioner för tolkning av VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp vid gastriskt karcinom

Gastriska karcinom som anses vara positiva för HER2-proteinöveruttryck måste uppfylla tröskelkriterierna för intensitet och mönster vid membranfärgning (2+ eller större på en skala från 0 till 3+) och för procenten positiva tumörceller. Färgningen måste lokaliseras till cellmembranet men behöver inte vara helt periferisk, eftersom basolateral färgning regelbundet observeras och bör övervägas för värdering. Färgning av cytoplasma och/eller kärnor kan förekomma, men denna färgning ingår inte i bestämningen av positivitet. Vid gastriskt karcinom beror procenten positiva tumörceller på huruvida provet är ett biopsiprover (≥ 5 kohesiva celler) eller ett resektionsprov (≥ 10 %).

Vid fastställande av riktlinjer för värdering för HER2 immunhistokemi vid gastrisk cancer ska det observeras att medan stark membranfärgning är bevis på HER2-proteinöveruttryck i neoplastiska celler, så behöver den inte vara helt periferisk.²⁹

Diffus cytoplasmisk färgning med eller utan nukleär färgning vid gastrisk cancer har rapporterats.³⁰ Endast membranfärgning bör användas vid fastställande av HER2-proteinöveruttryck vid gastrisk cancer.

Immunhistokemisk färgning med klon 4B5 kan producera cytoplasmisk och nukleär färgning av normal gastrisk slemhinna och mer sällan av neoplastiska celler i gastriskt karcinom och gastriskt/esofagealt karcinom. Denna cytoplasmiska och nukleära färgnings natur är för närvarande okänd. Detta färgningsmönster bör inte sammanblandas med den diskreta membranfärgningen, eftersom den är indikativ för HER2-positivitet i neoplastiska celler.

Se *Tolkningssguide för VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Staining of Breast and Gastric Carcinoma* för en mer detaljerad beskrivning med fotomikrografer av färgning med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp.

Tab. 6. Kriterier för intensitet och mönster av cellmembranfärgning med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp vid gastriskt karcinom.

Färgningsmönster – resektionsprov	Färgningsmönster – biopsiprover	Värde (rapport till begärande läkare)	Bedömning av HER2-färgning
Ingen reaktivitet eller membranreaktivitet i < 10 % av tumörcellerna	Ingen reaktivitet eller membranreaktivitet i någon tumörcell	0	Negativt
Svag/knappt märkbar membranreaktivitet i ≥ 10 % av tumörcellerna; cellerna är endast reaktiva i en del av membranet	Tumörcellskluster* med en svag/knappt märkbar membranreaktivitet oberoende av procentandel färgade tumörceller	1+	Negativt
Svag till måttlig fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i ≥ 10 % av tumörcellerna	Tumörcellskluster* med en svag till måttlig fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i oberoende av procentandel färgade tumörceller	2+	Tvetydig**

Färgningsmönster – resektionsprov	Färgningsmönster – biopsipro	Värde (rapport till begärande läkare)	Bedömning av HER2-färgning
Stark fullständig, basolateral eller lateral membran reaktivitet i $\geq 10\%$ av tumörcellerna	Tumörcellskluster* med en stark fullständig, basolateral eller lateral membranreaktivitet i oberoende av procentandel färgade tumörceller	3+	Positivt

* ≥ 5 kohesiva celler

** Rekommenderad reflex till ISH

BEGRÄNSNINGAR

Allmänna begränsningar

- Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialutbildning i valet av lämpliga reagenser, vävnadssnitt, fixering, bearbetning, beredning av det immunhistokemiska objektglaset och tolkning av färgningsresultaten.
- Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, bindande antikroppar eller falska negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan fås vid variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder eller från inneboende oregelbundenheter i vävnaden.
- Överdriven eller ofullständig kontrastfärgning kan leda till felaktig tolkning av resultaten.
- Den kliniska tolkningen av positiv färgning eller frånvaro därav, måste utvärderas inom ramen för klinisk historik, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av eventuell färgning eller frånvaro därav, måste kompletteras med morfologiska studier och korrekta kontroller samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patologs ansvar att känna till antikropparna, reagenserna och metoderna som används för att tolka det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat licensierat laboratorium under överinseende av en patolog som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att de positiva och negativa kontrollerna är tillräckliga.
- Antikroppar och reagenser från VENTANA tillhandahålls med optimal utspädning för användning när de medföljande instruktionerna följs. Avvikelser från rekommenderade testförfaranden kan ogiltigförklara förväntade resultat. Lämpliga kontroller måste användas och dokumenteras. Användare som avviker från rekommenderade testförfaranden måste ta ansvar för tolkningen av patientresultaten.
- Denna produkt är inte avsedd för användning i flödescytometri, prestandaegenskaper har inte fastställts.
- Reagenser kan visa oväntade reaktioner i tidigare otestade vävnader. Risken för oväntade reaktioner även i testade vävnadsgrupper kan inte elimineras fullständigt på grund av biologisk variation av antigenuttryck i neoplasmer eller andra patologiska vävnader.³¹ Kontakta din lokala supportrepresentant med dokumenterade oväntade reaktioner.
- Vävnader från personer som är infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatit B-ytantigen (HBsAg) kan uppvisa icke-specifik färgning med pepparrotsperoxidas.³²
- Falska positiva resultat kan ses på grund av icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av pseudoperoxidasaktivitet (erythrocyter), endogen peroxidasaktivitet (cytokrom C) eller endogen biotin (till exempel: lever, hjärna, bröst, njure) beroende på vilken typ av immunfärgning som använts.³³
- Som med alla immunhistokemiska test betyder ett negativt resultat att antigenet inte detekterades, inte att antigenet inte fanns i cellerna eller analyserad vävnad.

SPECIFIKA BEGRÄNSNINGAR

Antikroppen har optimerats enligt angivet i Tab. 1, och Tab. 2 för BenchMark IHC/ISH-instrument och detektionskemi. På grund av variation i vävnadsfixering och bearbetning kan det vara nödvändigt att öka eller minska primärantikroppens inkuberingsstid på enskilda prover. Ytterligare information om fixeringsvariabler finns i "Immunohistochemistry Principles and Advances".²⁶

Antikroppen, i kombination med VENTANA-detektionskit och tillbehör, detekterar antigen som överlever rutinformalinfixering, vävnadsbearbetning och snittning. Användare som avviker från rekommenderade testförfaranden är ansvariga för tolkningen och valideringen av patientresultaten.

Benmärg testades inte för specificitet. Användaren bör fastställa lämplig färgning i ovanstående vävnad före tolkning av färgningsinformation.

Immunhistokemisk färgning med klon 4B5 kan producera cytoplasmisk och nukleär färgning av normal gastrisk slemhinna och mer sällan av neoplastiska celler i gastriskt karcinom och gastriskt/esofagealt karcinom. Denna cytoplasmiska och nukleära färgnings natur är för närvarande okänd. Detta färgningsmönster bör inte sammanblandas med den diskreta membranfärgningen, den är indikativ för HER2-positivitet i neoplastiska celler.

Alla analyser kanske inte registreras på varje instrument. Kontakta din lokala Roche-representant för mer information.

PRESTANDAEGENSKAPER

Färgningstester för sensitivitet, specificitet och precision utfördes och resultaten sammanfattas nedan.

ANALYTISK PRESTANDA

Sensitivitet och specificitet

VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppssensitivitet/specificitet bestämdes av en studie som inte visade någon specifik membranfärgning för de flesta normala vävnader.

Färgningsresultat listas i Tab. 7. VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppssensitivitet och -specificitet bestämdes även av en studie som inte visade någon specifik membranfärgning i de flesta neoplastiska vävnader. Färgningsresultat listas i Tab. 8. Färgning för sensitivitet och specificitet utfördes med hjälp av *VIEW DAB Detection Kit*-protokollet på ett BenchMark XT-instrument eller *ultraView Universal DAB Detection Kit*-protokollet på ett BenchMark ULTRA-instrument listat ovan.

Positiv färgning i tonsillepitel, esofagusepitel, prostata, perifer nerv, bisköldkörtel, bröstcancer, kolon och äggstockscancer överensstämmer med publicerad litteratur om uttryck av HER2.

Tab. 7. Sensitivitet/specificitet för VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp bestämdes genom att testa normala FFPE-vävnader.

Vävnad	Antal positiva/totala fall	Vävnad	Antal positiva/totala fall
Cerebrum	0/6	Tunntarm	0/6
Cerebellum	0/6	Kolon	0/46
Binjure	0/6	Lever	0/6
Äggstock	0/6	Spotkörtel	0/3
Bukspotkörtel	0/6	Tunga	0/3
Lymfkörtel	0/12	Njure	0/6
Hypofys	0/5	Prostata	1/6
Testikel	0/6	Urinblåsa ^b	3/3
Sköldkörtel	0/6	Rektum	0/6
Bröst	0/14	Bisköldkörtel ^c	4/6
Mjälte	0/6	Endometrium	0/3
Tonsill ^a	3/6	Livmoder	0/3
Thymus	0/5	Cervix	0/5

Vävnad	Antal positiva/totala fall	Vävnad	Antal positiva/totala fall
Benmärg	0/3	Endocervix	0/1
Lunga	0/6	Skelettmuskulatur	0/6
Hjärta	0/5	Hud	0/6
Hjärtasäck	0/3	Nerv	2/6
Esofagus	1/6	Mesotel	0/3
Magsäck	0/11	Ej tillgängligt	Ej tillgängligt

^a fokal färgning på ytliga epitelceller

^b membranfärgning av ytliga parapycceller

^c fokal membranfärgning

Tab. 8. Sensitivitet/specificitet för VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppen har fastställts genom testning av olika neoplastiska FFPE-vävnader.

Patologi	Antal positiva/totala fall
Glioblastom (cerebrum)	0/2
Meningiom (cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	0/1
Seröst adenokarcinom (äggstock)	0/2
Karcinom, NOS (utan närmare specifikation) (äggstock)	1/2
Neuroendokrin neoplas (bukspottkörtel)	0/1
Adenokarcinom (bukspottkörtel)	0/1
Karcinom, NOS (bukspottkörtel)	0/3
Seminom (testikel)	0/1
Embryonalt karcinom (testikel)	0/1
Medullärt karcinom (sköldkörtel)	0/1
Papillärt karcinom (sköldkörtel)	0/1
Karcinom, NOS (sköldkörtel)	0/3
Mikroinvasivt duktalt karcinom (bröst)	2/2
Invasivt duktalt karcinom (bröst)	44/99
Karcinom, NOS (bröst)	1/4
Småcelligt karcinom (lunga)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (lunga)	0/1
Karcinom, NOS (lunga)	0/2
Adenokarcinom (lunga)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (esofagus)	0/1
Adenokarcinom (esofagus)	0/1
Mucinöst adenokarcinom (mage)	0/4
Adenokarcinom (mage)	8/88
Signetringcellskarcinom (mage)	0/4

Patologi	Antal positiva/totala fall
Karcinom, NOS (mage)	0/3
Adenokarcinom (tunntarm)	0/1
Gastrointestinal stromacellstumör (tunntarm)	0/1
Adenokarcinom (kolon)	0/32
Gastrointestinal stromacellstumör (kolon)	0/1
Karcinom, NOS (kolon)	1/3
Adenokarcinom (rektum)	1/5
Gastrointestinal stromacellstumör (rektum)	0/1
Melanom (rektum)	0/1
Hepatocellulärt karcinom (lever)	0/3
Hepatoblastom (lever)	0/1
Karcinom, NOS (lever)	0/3
Klarcellskarcinom (njure)	0/1
Karcinom, NOS (njure)	0/5
Adenokarcinom (prostata)	0/2
Karcinom, NOS (prostata)	0/3
Leiomyom	0/3
Adenokarcinom (livmoder)	0/1
Klarcellskarcinom (livmoder)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (cervix)	0/2
Embryonalt rbdomyosarkom (striated muskulatur)	0/1
Basalcellskarcinom (hud)	0/1
Skvamöst cellkarcinom (hud)	1/1
Neurofibrom (ländrygg)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mesoteliom (bukhinna)	0/1
Pleomorft rbdomyosarkom (bukhinna)	0/1
Lymfom, NOS	0/3
B-cellslymfom, NOS (mjälte)	0/1
B-cellslymfom, NOS (lymfkörtel)	0/2
Hodgkins lymfom (lymfkörtel)	0/1
Urotelialt karcinom (urinblåsa)	1/1
Leiomyosarkom (urinblåsa)	0/1
Osteosarkom (ben)	0/1
Leiomyosarkom (glatt muskulatur)	0/1
Adenokarcinom från rektum (metastatiskt)	0/1
Adenokarcinom från kolon (metastatiskt)	0/7

Patologi	Antal positiva/totala fall
Mucinöst adenokarcinom från kolon (metastatiskt)	0/1
Melanom	0/2
Neuroendokrin neoplasm, NOS	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Odifferentierat karcinom, NOS	0/1

Analytisk prestanda i bröstfall

Prestandakriterier på BenchMark ULTRA-instrument med VIEW DAB Detection Kit eller *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Färgning mellan laboratorier och reproducerbarhet mellan dagar på BenchMark ULTRA-instrumentet: Tre laboratorier, från separata institutioner i USA, deltog i reproducerbarhetsstudien mellan laboratorier. Snitt på objektglas från 48 FFPE-invasiva bröstkarcinomfall [12 vardera från varje HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] och 1 par PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides per vardera av 12 färgningskörningar distribuerades till studieplatser för färgning på ett BenchMark ULTRA-instrument med användning av rekommenderat färgningsprotokoll och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides och ett andra objektglas för respektive fall, färgat med negativ Ig-reagens. Patologer som var blindade med avseende på fallstatus utvärderade bilderna och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultaten analyserades av Ventana. Med hjälp av standardnomenklatur för 2x2 tabeller beräknades genomsnittlig positiv överensstämmelse (APA) över platser som $[2a/(2a + b + c)]$ och genomsnittlig negativ överensstämmelse (ANA) som $[2d/(2d + b + c)]$. På alla platser var APA mellan platser baserat på klinisk bedömning (positivt, negativt) 90.0 % (108/120) och ANA var 92.9 % (156/168). För parvisa jämförelser av platser beräknades APA som $a/(a+c)$ och ANA beräknades som $d/(b+d)$. APA-förhållandet mellan platser var 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) och 89.5 % (34/38) för Plats A jämfört med Plats B, Plats A jämfört med Plats C och Plats B jämfört med Plats C. ANA-förhållandet mellan platser var 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) och 93.1 % (54/58) för Plats A jämfört med Plats B, Plats A jämfört med Plats C och Plats B jämfört med Plats C.

Följande tabeller är 3x3-presentationer av resultat för respektive läsare baserat på kliniska värden där 2+ och 3+ separerades.

Tab. 9. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats A och Plats B – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Plats A	Plats B			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Totalt	12	9	27	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%)				
43/48 (89.6)				

Tab. 10. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats A och Plats C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Plats A	Plats C			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26

Plats A	Plats C			Totalt
	3+	2+	0, 1+	
Totalt	12	5	31	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%)				
42/48 (87.5)				

Tab. 11. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan laboratorier Plats B och Plats C – klon 4B5 BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Plats B	Plats C			Totalt
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Totalt	12	5	31	48
Övergripande överensstämmelse i procent (OPA): n/N (%)				
44/48 (91.7)				

Reproducerbarhet av färgning mellan dagar på BenchMark ULTRA-instrument

Delen om reproducerbarhet mellan dagar (IDR) i studien inkluderade 12 fall med en avsedd fördelning av cirka tre (3) fall vid varje klinisk värdering (0, 1+, 2+, 3+). Totalt genomfördes de fem körningarna på BenchMark ULTRA-instrumentet vid den enskilda institutionen (Plats C) som genomför IDR-delen av studien under minst 20 dagar, så att inte två färgningsdagar var i följd. APA- och ANA-värdena vid IDR baserade på klinisk bedömning av klon 4B5-färgning vid Plats C över alla dagar var båda 100 %. De övergripande överensstämmelse i procent (OPA) för jämförelser mellan dagar baserat på kliniska värden var 100 % för var och en av de dagliga jämförelserna och för alla dagar tillsammans.

Jämförelsestudie av BenchMark ULTRA-instrument och BenchMark XT-instrument

Två färgningslaboratorier och tre laboratorier i USA deltog i plattformsjämförelsestudien. Snitt på objektglas med 280 FFPE-invasiva fall av bröstkarcinom [cirka 70 fall från varje HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] fördelades slumpmässigt till två färgningsplatser (140 fall till varje plats) för färgning på ett BenchMark XT-instrument och ett BenchMark ULTRA-instrument med respektive rekommenderade färgningsprotokoll och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides och ett andra objektglas för respektive fall, färgat med negativ Ig-reagens. Färgade fall från Plats 1 och Plats 2 delades in i fyra objektglassatser och tillhandahölls, en uppsättning i taget, till tre olika kvalificerade läsare (patologer), en läsare på Plats 1, en på Plats 2 och en på Plats 3. Patologerna, som var blindade med avseende på fallstatus och färgningsplattform, utvärderade alla fyra uppsättningarna av objektglas och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+) för varje fall. Resultaten analyserades av Ventana. PPA-värdena (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikroppsfärgning på BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) och 94.9 % (89.3) för Läsare A, B respektive C. NPA-värdena (och nedre gräns för de tvåsidiga konfidensintervallen på 95 %) för klon 4B5-antikroppsfärgning på BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på kliniska bedömningar (positiva, negativa) var 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) och 99.3 % (96.3) för Läsare A, B respektive C. OPA mellan klon 4B5-färgning med BenchMark ULTRA-instrumentet jämfört med BenchMark XT-instrumentet baserat på 2x2-analys av kliniska bedömningar (positiva, negativa) var 91.8 %, 92.5 % och 97.4 % för Läsare A, B respektive C. 3x3-presentationen av överensstämmelsegrader mellan plattformar för varje läsare baserat på kliniskt värde (0/1+, 2+, 3+) visas i tabellerna nedan:

Tab. 12. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark ULTRA-instrument jämfört med BenchMark XT-instrument – Läsare A.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare A	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Totalt	96	47	124	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 226/267 (84.6) (79.8–88.5) (%) (95 % CI)				

Tab. 13. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark ULTRA-instrument jämfört med BenchMark XT-instrument – Läsare B.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare B	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Totalt	69	68	130	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 242/267 (90.6) (86.5–93.6) (%) (95 % CI)				

Tab. 14. 3x3-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark ULTRA-instrument jämfört med BenchMark XT-instrument – Läsare C.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Läsare C	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Totalt	66	52	149	267
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 257/267 (96.3) (93.2–98.0) (%) (95 % CI)				

Reproducerbarhet av prover från instrumentjämförelsestudie mellan patologer

Positiva och negativa överensstämmelsegrader med dubbelsidigt 95 % värdekonfidensintervall beräknades för de sex möjliga parvisa jämförelserna mellan läsarna för varje plattform.

För BenchMark ULTRA-instrument var PPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) respektive 83.5 % (111/133). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) respektive 98.5 % (132/134). OPA-värdet var högst mellan Läsare A och Läsare B (91.8 %) och lägre mellan Läsare B och Läsare C (91.0 %) och Läsare A och Läsare C (88.8 %).

För BenchMark XT-instrument var PPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118),

90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) respektive 84.7 % (116/137). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) respektive 98.5 % (128/130). OPA-värdet var högst mellan Läsare A och Läsare B (92.5 %) och lägre mellan Läsare B och Läsare C (91.4 %) och Läsare A och Läsare C (89.1 %).

Jämförelsestudie av *VIEW DAB Detection Kit* och *ultraView Universal DAB Detection Kit*

Plats 1-kohorten på 140 FFPE invasiva bröstcancerfall [ungefär 35 fall från respektive HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] användes i en jämförelsestudie av *VIEW DAB Detection Kit* och *ultraView Universal DAB Detection Kit* vid färgning med klon 4B5 på BenchMark ULTRA-instrument. Ett enda färgningslaboratorium och tre laboratorier i USA deltog i detektionsjämförelsestudien. För klon 4B5-antikroppsfärgning på BenchMark ULTRA-instrumentet var PPA-förhållandet mellan resultat erhållna med *VIEW DAB Detection Kit* och *ultraView Universal DAB Detection Kit*-metoder baserat på klinisk bedömning (positiv, negativ) 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) och 96.5 % (55/57) för Läsare A, B respektive C och NPA-förhållandet mellan detektionsmetoder var 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) och 97.5 % (77/79) för Läsare A, B respektive C. OPA-värdena mellan detektionskit var 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) och 97.1 % (132/136) för Läsare A, B respektive C. 3x3-presentationen av överensstämmelsegrader för detektionsjämförelse för varje läsare baserat på kliniskt värde (0/1+, 2+, 3+) visas i tabellerna nedan

Tab. 15. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare A: *VIEW DAB Detection Kit* jämfört med *ultraView Universal DAB Detection Kit* – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Läsare A	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Totalt	46	25	65	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 119/136 (87.5) (80.9–92.0) (%) (95 % CI)				

Tab. 16. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare B: *VIEW DAB Detection Kit* jämfört med *ultraView Universal DAB Detection Kit* – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Läsare B	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Totalt	33	32	71	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 128/136 (94.1) (88.8–97.0) (%) (95 % CI)				

Tab. 17. 3x3-analys av överensstämmelsegrader för Läsare C: *VIEW DAB Detection Kit* jämfört med *ultraView Universal DAB Detection Kit* – klon 4B5-färgning på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Läsare C	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79

VIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Läsare C	3+	2+	0, 1+	Totalt
Totalt	32	25	79	136
Övergripande överensstämmelse i procent: n/N 132/136 (97.1) (92.7–98.9) (%) (95 % CI)				

Reproducerbarhet av prover från detektionsjämförelsestudie mellan patologer:

Positiva och negativa överensstämmelsegrader med dubbelsidigt 95 % värdekonfidenstervall beräknades för de sex möjliga parvisa jämförelserna mellan läsarna för varje metod.

För VIEW DAB Detection Kit var PPA-förhållandena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A, och C mot B 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) respektive 79.7 % (55/69). NPA-förhållandena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) respektive 97.0 % (65/67). Övergripande överensstämmelsegrad var högst mellan Läsare A och Läsare B (96.3 %) och lägre mellan Läsare A och Läsare C (86.0 %) och Läsare B och Läsare C (88.2 %).

För ultraView Universal DAB Detection Kit var PPA-förhållandena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A, och C mot B 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71), respektive 86.2 % (56/65). NPA-värdena för Läsare A mot B, A mot C, B mot C, B mot A, C mot A och C mot B var 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) respektive 98.6 % (70/71). Övergripande överensstämmelsegrad var liknande för respektive läsarpär, 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136), och 92.6 % (126/136) för Läsare A mot B, Läsare A mot C respektive Läsare B mot C.

Reproducerbarhetsstudier mellan laboratorier och mellan läsare på BenchMark ULTRA PLUS-instrument med ultraView Universal DAB Detection Kit

Tre laboratorier, från separata institutioner i USA, deltog i den interlaboratoriella reproducerbarhetsstudien. Snitt på objektglas från 28 FFPE-invasiva bröstkarinomfall [7 var från HER2-kategorier (0, 1+, 2+, 3+)] och ett par kontrollobjektglas (ett PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide och ett fall med kontrollvävnad med bröstkarinom) för var och en av 10 färgningskomingar distribuerades till varje studie för färgning på ett BenchMark ULTRA PLUS-instrument med det rekommenderade färgningsprotokollet och ultraView Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, ett fall med kontrollvävnad med bröstkarinom och ett andra objektglas för respektive testfall, färgat med negativ Ig-reagens. Patologer som var blindade med avseende på fallstatus utvärderade bilderna och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultaten analyserades av Ventana.

Reproducerbarheten för HER2-status (positiv eller negativ) utvärderades för alla utvärderingsbara fallobjektglas med modal HER2-status på fallnivå som referens för varje fall. I syfte att beräkna överensstämmelsegrader ansågs ett HER2-värde på 0 eller 1+ som negativt och en HER2-värde på 2+ eller 3+ ansågs som positivt. Modal HER2-status för varje fall fastställdes som det mest frekvent observerade läsarResultatet (positivt eller negativt) för det givna fallet. Alla observationer som insamlats genom pooling av alla platser, läsare, dagar och fall för hela populationen av utvärderingsbara objektglas jämfördes med modala HER2-statusresultat. PPA, NPA och OPA för den poolade analysen var 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420) respektive 97.7 % (821/840). Reproducerbarhet för HER2-status utvärderades också som APA-, ANA- och OPA-förhållanden för alla möjliga parvisa jämförelser mellan platser och för alla platsjämförelser kombinerade. För reproducerbarhet mellan platser var APA, ANA och OPA 95.9 %, 95.9 % respektive 95.9 %. För reproducerbarhet mellan läsare var resultaten för APA, ANA och OPA 95.5 %, 95.5 % och 95.5 %. För reproducerbarhet mellan dagar var APA, ANA och OPA 97.0 %, 97.0 % och 97.0 %. Tvåsidiga 95 % konfidenstervall beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden.

Tabell 18–21 är representativa presentationer av dessa resultat.

Tab. 18. Poolad överensstämmelse för HER2-status med modalstatus på fallnivå för fall med bröstkarinom som färgats med anti-HER2 (4B5)-antikropp på BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-status	BenchMark ULTRA PLUS modalstatus		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	411	10	421
Negativt	9	410	419
Totalt	420	420	840
	n/N	% (95 % CI)	
Positiv överensstämmelse i procent	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Negativ överensstämmelse i procent	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Övergripande överensstämmelse i procent	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

Tab. 19. Poolade överensstämmelsegrader mellan platser för parvisa jämförelser av HER2-status för fall med bröstkarinom som färgats med anti-HER2 (4B5)-antikropp på BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-status från Plats i	HER2-status från Plats j		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	4037	163	4200
Negativt	183	4017	4200
Totalt	4220	4180	8400
	n/N	% (95 % CI)	
Genomsnittlig positiv överensstämmelse	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Genomsnittlig negativ överensstämmelse	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Övergripande överensstämmelse i procent	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Obs! Plats i och j är de platser (Plats A, Plats B och Plats C) som används i studien. Den poolade överensstämmelsegraden beräknas genom att poola alla möjliga jämförelser mellan alla platser (Plats A mot B, A mot C och B mot C).

Tab. 20. Poolade överensstämmelsegrader mellan läsare för parvisa jämförelser av HER2-status för fall med bröstkarinom som färgats med anti-HER2 (4B5)-antikropp på BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-status från Läsare 1	HER2-status från Läsare 2		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	201	9	210
Negativt	10	200	210
Totalt	211	209	420
	n/N	% (95 % CI)	
Genomsnittlig positiv överensstämmelse	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Genomsnittlig negativ överensstämmelse	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Övergripande överensstämmelse i procent	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Obs! Läsare 1 och 2 är läsarna från samma studieplats (Plats A, Plats B eller Plats C) som används i studien. Den poolade överensstämmelsegraden beräknas genom att poola läsaroöverensstämmelse inom en plats på alla studieplatser.

Tab. 21. Poolade överensstämmelsegrader mellan dagar för parvisa jämförelser av HER2-status för fall med bröstkarinon som färgats med anti-HER2 (4B5)-antikropp på BenchMark ULTRA PLUS.

HER2-status från Dag i	HER2-status från Dag j		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	817	15	832
Negativt	35	813	848
Totalt	852	828	1680
	n/N	% (95 % CI)	
Genomsnittlig positiv överensstämmelse	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Genomsnittlig negativ överensstämmelse	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Övergripande överensstämmelse i procent	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Obs! Dag i och j är dagarna (Dag 1 till Dag 5) från studiens färgningsdagar. Den poolade överensstämmelsegraden beräknas genom att poola alla möjliga jämförelser mellan valfria två dagar inom varje läsare från varje plats.

Jämförelsestudie av BenchMark ULTRA PLUS-instrument och BenchMark ULTRA-instrument

Tre laboratorier, från separata institutioner i USA, deltog i en överensstämmelsestudie av BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet och BenchMark ULTRA-instrumentet. Snitt på objektglas med 122 FFPE-invasiva fall av bröstkarinon fall från varje HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+) färgades av Ventana på ett BenchMark ULTRA-instrument med rekommenderat färgningsprotokoll och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna omfattade ett PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide och ett fall med positiv kontrollvävnad med bröstkarinon per färgningskörning. Dessutom färgades ett andra objektglas från varje testfall med negativ Ig-reagens. Skurna objektglas från samma fall randomiserades och distribuerades jämnt (40–41 fall/plats) på de olika studieplatserna för att färgas på ett BenchMark ULTRA PLUS-instrument med det rekommenderade färgningsprotokollet och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerna omfattade ett PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide och ett fall med positiv kontrollvävnad med bröstkarinon per färgningskörning. Dessutom färgades ett andra objektglas från varje testfall med negativ Ig-reagens. Patologer, som var blindade med avseende på fallstatus, utvärderade objektglasen som färgats på ett BenchMark IHC/ISH-instrument och gav ett kliniskt värde (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Efter en 2 veckor lång washout-period utvärderade patologerna objektglasen som färgats på det andra BenchMark IHC/ISH-instrumentet. Resultaten analyserades av Ventana. Ett HER2-värde på IHC 0+ eller 1+ ansågs som negativt och ett HER2-värde på IHC 2+ eller 3+ ansågs som positivt. OPA-, PPA- och NPA-värdena var 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) respektive 89.1 % (179/201). Tvåsidiga 95 % konfidensintervall beräknades med hjälp av percentil bootstrap-metoden. Acceptabilitet för morfologi och bakgrund för alla fall var 100 % för båda instrumenten. Tabell 22 är presentationen av dessa resultat.

Tab. 22. Poolad överensstämmelse för HER2-status för fall av bröstkarinon som färgats med anti-HER2 (4B5)-antikropp på BenchMark ULTRA PLUS- jämfört med BenchMark ULTRA-instrument

BenchMark ULTRA PLUS HER2-status	BenchMark ULTRA HER2- status		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positivt	154	22	176
Negativt	11	179	190
Totalt	165	201	366
	n/N	% (95 % CI)	

BenchMark ULTRA PLUS HER2-status	BenchMark ULTRA HER2- status		Totalt
	Positivt	Negativt	
Positiv överensstämmelse i procent	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Negativ överensstämmelse i procent	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Övergripande överensstämmelse i procent	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

Analytisk prestanda i gastriska fall

Precisionsstudier för BenchMark ULTRA- och BenchMark XT-instrument:

Repetierbarhet mellan körningar på BenchMark XT-instrumentet utfördes under fem körningar under en period på 5 spridda dagar. Fem objektglas med tre fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ för HER2-uttryck uppvisade 100 % överensstämmelse inom det positiva/negativa värdet för varje vävnad.

Repetierbarhet inom körning på BenchMark XT-instrumentet utfördes på 28 objektglas med tre fall av gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck. Alla fall fick motsvarande värde inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet inom plattform undersöktes på tre BenchMark XT-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 30 objektglas från var och en av två olika multivävnadsblock med tre fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet inom plattform testades på tre BenchMark ULTRA-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 15 objektglas från ett multivävnadsblock lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet mellan plattformar testades på tre BenchMark XT- och tre BenchMark ULTRA-instrument. I dessa körningar uppvisade alla 30 objektglas från ett multivävnadsblock lika resultat inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Jämförelse av *VIEW* DAB Detection Kit och *ultraView* Universal DAB Detection Kit med gastriska fall

Klon 4B5 användes för att utföra tester på detektionskit på två instrument (BenchMark XT-instrument och BenchMark ULTRA-instrument), med *VIEW* DAB Detection Kit och *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Tvåhundra fall vävnadsfall användes som en del av testningen. De färgade objektglasen utvärderades med avseende på positivt/negativt kliniskt värde.

Acceptabilitet för morfologi och bakgrund var 100 % för både detektionskit och instrument. Direkta jämförelser av positiva och negativa kliniska bedömningar av detektionskiten för varje instrument presenteras i följande tabeller.

Tab. 23. Klinisk bedömning av *ultraView* Universal DAB Detection Kit jämfört med *VIEW* DAB Detection Kit på BenchMark XT-instrumentet.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	21	0	21
Negativt	0	189	189
Totalt	21	189	210
	n/N	%	
Positiv överensstämmelse i procent	21/21	100	
Negativ överensstämmelse i procent	189/189	100	
Övergripande överensstämmelse i procent	210/210	100	

Tab. 24. Jämförelse av klinisk bedömning på BenchMark XT- och BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT-instrument med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA-instrument med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	20	1	21
Negativt	0	189	189
Totalt	20	190	210
	n/N	% (95 % CI)	
Positiv överensstämmelse i procent	20/20	100 (83.9-100)	
Negativ överensstämmelse i procent	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Övergripande överensstämmelse i procent	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

Reproducerbarhet mellan laboratorier för klon 4B5 vid gastriskt karcinom:

Studien utfördes på tre testplatser. Prover samlades in till studien baserat på klon 4B5 kliniskt IHC-värde, så att det fanns ungefär lika många positiva (3+) och negativa (0, 1+) fall. Dessutom studerades upp till fyra fall av 2+-kvalificerade fall av gastrisk cancer.

De tre platserna använde ett BenchMark XT-instrument och ett BenchMark ULTRA-instrument för att utföra fyra färgningskörningar per instrument. Fallen randomiserades för färgning med en stratifierad randomiseringsprocedur som tilldelade fall så att varje körning innehöll fall som motsvarade alla värdekategorier för HER2 vid gastrisk cancer.

Körningarna på varje instrument på varje plats innehöll samma fall. På varje plats färgades ett objektglas från varje fall med klon 4B5 och ett annat objektglas från samma fall färgades med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig på BenchMark ULTRA-instrumentet. Ett andra par objektglas från samma fall färgades på samma sätt på BenchMark XT-instrumentet på varje plats. Fallens objektglas värderades av en kvalificerad läsare på varje plats som var blindad med avseende på tidigare fastställt kliniskt IHC-värde för varje prov.

Övergripande överensstämmelse för alla utvärderingsbara fall var 100 % för alla tre jämförelser mellan platser på både BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark XT-instrumentet. Övergripande överensstämmelse mellan BenchMark ULTRA-instrumentet och BenchMark XT-instrumentet för utvärderingsbara fall var 100 % på var och en av de tre platserna. Acceptabilitet för morfologi och bakgrund för alla fall var 100 % för båda instrumenten på Plats A och C och > 95 % för båda instrumenten på Plats B. Se tabeller nedan.

Tab. 25. Övergripande överensstämmelse av klinisk bedömning mellan platser: gastriskt karcinom, alla utvärderingsbara fall.

BenchMark ULTRA-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent
Plats A mot Plats B: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)
Plats A mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)
Plats B mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	30/30 (100 %) (88.6–100)
BenchMark XT-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent
Plats A mot Plats B: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)
Plats A mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)
Plats B mot Plats C: n/N (%) (95 % CI)	31/31 (100 %) (89.0–100.0)

Tab. 26. Övergripande överensstämmelse av klinisk bedömning mellan plattformar: gastriskt karcinom alla utvärderingsbara fall.

BenchMark ULTRA-instrument mot BenchMark XT-instrument	Övergripande överensstämmelse i procent
Plats A: n/N (%) (95 % CI)	40/40 (100 %) (91.2–100)
Plats B: n/N (%) (95 % CI)	34/34 (100 %) (89.8–100)
Plats C: n/N (%) (95 % CI)	32/32 (100 %) (89.3–100)

Tab. 27. Bakgrundsacceptans och acceptabilitet för morfologi: gastriskt karcinom, alla fall.

BenchMark ULTRA-instrument	Plats A	Plats B	Plats C
Acceptabilitet för morfologi	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Bakgrundsacceptans	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
BenchMark XT-instrument	Plats A	Plats B	Plats C
Acceptabilitet för morfologi	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Bakgrundsacceptans	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

Jämförelsestudie av BenchMark-instrument och BenchMark GX-instrument med BenchMark XT-instrument: Gastriskt karcinom

Skurna objektglas med 3 TMA som innehöll FFPE-fall av gastriskt karcinom [cirka 50 fall per TMA] färgades på ett BenchMark XT-instrument, BenchMark-instrument och BenchMark GX-instrument med respektive rekommenderade färgningsprotokoll för *ultraView* Universal DAB Detection Kit och *VIEW* DAB Detection Kit. Kontrollerna innefattade PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides och ett andra objektglas för varje TMA, färgat med negativ Ig-reagens. De färgade objektglasen bedömdes av en läsare (patolog).

Övergripande överensstämmelsegrad (och lägre gräns för tvåsidiga 95 % konfidensintervall) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserad på klinisk bedömning (positiv, negativ) var som följer: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.0 % (94.2–99.3), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97.4 % (93.6–99.0), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 96.6 % (92.7–98.4), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 95.9 % (91.8–98.0).

Positiv överensstämmelsegrad (och lägre gräns för tvåsidiga 95 % konfidensintervall) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserad på klinisk bedömning (positiv, negativ) var som följer: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91.7 % (64.4–98.5), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78.6 % (52.4–92.4), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 80.0 % (54.8–93.0), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 73.3 % (48.0–89.1).

Negativ överensstämmelsegrad (och lägre gräns för tvåsidiga 95 % konfidensintervall) för klon 4B5-antikroppsfärgning baserad på klinisk bedömning (positiv, negativ) var som följer: BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8–99.6), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1–99.9), BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.6–99.4), BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.5–99.3). 2x2-presentationen av överensstämmelsegrader för varje jämförelse baserad på kliniskt värde (positivt, negativt) visas i tabellerna nedan.

Tab. 28. 2x2-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	11	2	13
Negativt	1	133	134
Totalt	12	135	147
	n/N	% (95 % CI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	144/147	98.0 % (94.2–99.3)	
Positiv överensstämmelse i procent	11/12	91.7 % (64.6–98.5)	
Negativ överensstämmelse i procent	133/135	98.5 % (94.8–99.6)	

Tab. 29. 2x2-analys av överensstämmelsegrad mellan plattformar för BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	11	1	12
Negativt	3	140	143
Totalt	14	141	155
	n/N	% (95 % CI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	151/155	97.4 % (93.6–99.0)	
Positiv överensstämmelse i procent	11/14	78.6 % (52.4–92.4)	
Negativ överensstämmelse i procent	140/141	99.3 % (96.1–99.9)	

Tab. 30. 2x2-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	12	3	15
Negativt	3	156	159
Totalt	15	159	174
	n/N	% (95 % CI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	168/174	96.6 % (92.7–98.4)	
Positiv överensstämmelse i procent	12/15	80.0 % (54.8–93.0)	

Klon 4B5 med <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positivt	Negativt	Totalt
Negativ överensstämmelse i procent	156/159	98.1 % (94.6–99.4)	

Tab. 31. 2x2-analys av överensstämmelsegrader mellan plattformar för BenchMark GX-instrument mot BenchMark XT-instrument med *VIEW* DAB Detection Kit: gastriskt karcinom.

Klon 4B5 med <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
BenchMark GX-instrument	BenchMark XT-instrument		
	Positivt	Negativt	Totalt
Positivt	11	3	14
Negativt	4	154	158
Totalt	15	157	172
	n/N	% (95 % CI)	
Övergripande överensstämmelse i procent	165/172	95.9 % (91.8–98.0)	
Positiv överensstämmelse i procent	11/15	73.3 % (48.0–89.1)	
Negativ överensstämmelse i procent	154/157	98.1 % (94.5–99.3)	

Precisionsstudier för BenchMark ULTRA PLUS-instrument

Repetierbarhet inom körning på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet utfördes på 120 objektglas på 24 fall av gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck. Alla fall fick motsvarande värde inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp. Repeterbarhet mellan körningar på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet utfördes på i fem körningar under 5 (spridda) dagar med 240 objektglas för 24 fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck. Alla fall fick motsvarande värde inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Repetierbarhet inom plattform utfördes på tre BenchMark ULTRA PLUS-instrument. Dessa körningar gav 144 objektglas från 24 fall med gastrisk vävnad med värde 0, 1+, 2+ och 3+ HER2-uttryck. Alla fall fick motsvarande värde inom det positiva/negativa värdet för varje vävnadstyp.

Överensstämmelse av resultat mellan BenchMark ULTRA PLUS- och BenchMark ULTRA-instrument

Skurna objektglas av 94 FFPE-fall av gastriskt karcinom färgades på ett BenchMark ULTRA PLUS-instrument och BenchMark ULTRA-instrument med respektive rekommenderade färgningsprotokoll för *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollerade omfattade ett HER2-positivt fall av gastriskt karcinom för varje färgningskörning och ett andra testobjektglas som färgats med negativ Ig-reagens. De färgade objektglasen bedömdes av en läsare (patolog).

Övergripande överensstämmelsegrad för anti-HER2 (4B5)-antikroppsfärgning baserat på status (positiv, negativ) var 98.9 %. Positiv överensstämmelsegrad och negativ överensstämmelsegrad var 100.0 % respektive 98.4 %. Tvåsidiga konfidensintervall på 95 % beräknades med hjälp av Wilson score-metoden. Acceptabilitet för morfologi och bakgrund för alla fall var 100 % för båda instrumenten.

KLINISK PRESTANDA

Jämförelsestudier av klon 4B5 kanin monoklonal antikropp med PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody vid bröstcancer

En metodjämförelsestudie genomfördes för att undersöka korrelationen av klon 4B5 med PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp) och PathVysion HER2 FISH, båda tidigare FDA-godkända diagnostiska

tester. Sex utredare deltog i studien. Två uppsättningar med tre olika utredare utvärderade två oberoende kohorter (kohort 1: n = 178, kohort 2: n = 144) med kända bröstcancervall färgade med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp och klon 4B5. FISH-data inhämtades från patienthistorik. Ett konsensusvärde från de tre läsarna för varje antikropp skapades för varje fall för att minska variation inom läsare som man känner till med HER2-bedomning.^{34,35,36} Totalt 322 fall bedömdes. Objektglasen färgade med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp bearbetades och färgades enligt tillverkarens instruktioner som anges i PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsmetodbladet. Det var i genomsnitt ungefär ett år mellan färgning och läsning av PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsfärgade objektglas. Eftersom värden från en av de sex läsarna låg utanför konfidensintervallet (CI) presenteras data från de två kohorterna enligt följande:

Reproducerbarhet av prover från jämförelsestudie mellan patologer

Tab. 32. Kohort 1 – konsensus av IHC-värden från tre patologer.

Klon 4B5-värde	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsvärde			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Totalt	31	37	75	143

Kohort 1: Prestandaegenskaper för 3 x 3-presentation.

Total överensstämmelse är $(29+13+53)/143 = 66.4\%$ (95 % CI = 38.6 %–59.7 %).

Kohort 1: Prestandaegenskaper för 2 x 2-presentation (värden för HER-2-antikropp positiv (2+ och 3+) och negativ (0 och 1+) är kombinerade).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(29+2+24+13)/(31+37) = 100\%$ (95 % CI = 97.5 %–100 %).
- Negativ överensstämmelse i procent är $53/75 = 70.7\%$ (95 % CI = 58.5 %–80.1 %).

Total överensstämmelse är $(29+24+2+13+53)/143 = 84.7\%$ (95 % CI = 78.2 %–90.0 %).

Tab. 33. Kohort 2 – konsensus av IHC-värden från tre patologer.

Klon 4B5-värde	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsvärde			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Totalt	73	20	85	178

Kohort 2: Prestandaegenskaper för 3 x 3-presentation.

Total överensstämmelse är $(72+12+80)/178 = 92.1\%$ (95 % CI = 80.1 %–93.1 %).

Kohort 2: Prestandaegenskaper för 2 x 2-presentation (värden för HER2-antikropp positiv (2+ och 3+) och negativ (0 och 1+) är kombinerade).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(72+12+1+1)/(73+20) = 92.5\%$ (95 % CI = 85.2 %–96.9 %).
- Negativ överensstämmelse i procent är $80/85 = 94.1\%$ (95 % CI = 86.8 %–98.1 %).

Total överensstämmelse är $(72+12+1+1+80)/178 = 93.3\%$ (95 % CI = 88.5 %–96.4 %).

Tab. 34. Kohort 1 – konsensus av PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC-värden från tre patologer jämfört med FISH.

PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsvärde	FISH-resultat		
	Positivt	Negativt	Totalt
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Totalt	86	58	144

Kohort 1: Prestandaegenskaper för PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC och FISH, 2 x 2-presentation (där värdena 2 och 3 anses vara positiva).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(32+32)/86 = 74.4\%$ (95 % CI = 63.8 %–83.2 %).
- Negativ överensstämmelse i procent är $53/58 = 91.4\%$ (95 % CI = 80.9 %–97.1 %).

Total överensstämmelse är $(32+32+53)/144 = 81.2\%$ (95 % CI = 73.9 %–87.2 %).

Tab. 35. Kohort 1 – konsensus av klon 4B5 IHC-värden från tre patologer jämfört med FISH.

Klon 4B5-värde	FISH-resultat		
	Positivt	Negativt	Totalt
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Totalt	86	58	144

Kohort 1: Prestandaegenskaper för klon 4B5 och FISH, 2 x 2-presentation (där värdena 2 och 3 anses vara positiva).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(55+25)/86 = 93.0\%$ (95 % CI = 87.9 %–96.3 %).
- Negativ överensstämmelse i procent är $47/58 = 81.0\%$ (95 % CI = 73.4 %–86.0 %).

Total överensstämmelse är $(55+25+47)/144 = 88.2\%$ (95 % CI = 82.1 %–92.2 %).

Tab. 36. Kohort 2 – konsensus av PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC-värden från tre patologer jämfört med FISH.

PATHWAY HER2 (CB11)-antikroppsvärde	FISH-resultat		
	Positivt	Negativt	Totalt
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Totalt	93	85	178

Kohort 2: Prestandaegenskaper för PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC och FISH, 2 x 2-presentation (där värdena 2 och 3 anses vara positiva).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(72+13)/93 = 91.3\%$ (95 % CI = 85.0 %–96.7 %).
- Negativ överensstämmelse i procent är $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 83.9 %–96.3 %).

Total överensstämmelse är $(72+13+77)/178 = 91.0\%$ (95 % CI = 86.5 %–94.9 %).

Tab. 37. Kohort 2 – konsensus av klon 4B5 IHC-värden från tre patologer jämfört med FISH.

Klon 4B5-värde	FISH-resultat		
	Positivt	Negativt	Totalt
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Totalt	93	85	178

Kohort 2: Prestandaegenskaper för Klon 4B5 och FISH, 2 x 2-presentation (där värdena 2 och 3 anses vara positiva).

- Positiv överensstämmelse i procent är $(72+11)/93 = 89.2\%$ (95 % CI = 82.5 %–95.1 %).
 - Negativ överensstämmelse i procent är $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 84.0 %–96.4 %).
- Total överensstämmelse är $(72+11+77)/178 = 90.0\%$ (95 % CI = 85.4 %–93.6 %).

Reproducerbarhet av prover från jämförelsestudie mellan patologer

Eftersom det är välkänt att olika patologer kan ha olika tolkningar av immunhistokemi-objektglas anlitas tre patologer för var och en av de två kohorterna (totalt 6 patologer) för att läsa alla prover. En två-av-tre-regel användes för att döma de slutliga resultaten. Nedan redovisas en sammanfattning av de variabla resultaten som erhållits av de tre patologerna i jämförelsestudieproverna för varje kohort.

Tab. 38. Kohort 1: Klon 4B5-värde från de tre patologerna.

HER2-värde	Klon 4B5-värde		
	Utredare 1	Utredare 2	Utredare 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Totalt	174	178	178

Obs! Totalt 3 prover varierade med mer än en klassnivå (dvs. 0, 2+) när de utvärderades av de tre patologerna.

Prov 1: En patolog fick värdet 2+, två patologer fick värdet 0.

Prov 2: En patolog fick värdet 0, två patologer fick värdet 2+.

Prov 3: En patolog fick värdet 0, den andra fick 1+ och den tredje fick värdet 2+.

Tab. 39. Kohort 1: PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC-värde från de tre patologerna.

HER2-värde	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsvärde		
	Utredare 1	Utredare 2	Utredare 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Totalt	174	178	178

Obs! Totalt 1 prov varierade med mer än en klassnivå (dvs. 1, 3+) när de utvärderades av de tre patologerna.

Prov 1: En patolog fick värdet 1+, den andra fick 2+ och den tredje fick värdet 3+.

Tab. 40. Kohort 2: Klon 4B5-värde från de tre patologerna.

HER2-värde	Klon 4B5-värde		
	Utredare 4	Utredare 5	Utredare 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Totalt	141	144	144

Obs! Totalt 6 prover varierade med mer än en klassnivå (dvs. 0, 3+) när de utvärderades av de tre patologerna.

Prov 1: En patolog fick värdet 0, den andra fick 0 och den tredje fick värdet 2+.

Prov 2: En patolog fick värdet 1+, den andra fick 1+ och den tredje fick värdet 3+.

Prov 3: En patolog fick värdet 0, den andra fick 2+ och den tredje patologen fick värdet 2+.

Prov 4 och 5: En patolog fick värdet 0, den andra fick 2+ och den tredje fick värdet 2+.

Prov 6: En patolog fick värdet 0, den andra fick 3+ och den tredje fick värdet 3+.

Tab. 41. Kohort 2: PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp IHC-värde från de tre patologerna.

HER2-värde	PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikroppsvärde		
	Utredare 4	Utredare 5	Utredare 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Totalt	144	144	144

Obs! Totalt 8 prover varierade med mer än en klassnivå (dvs. 0–2+) när de utvärderades av de tre patologerna.

Prov 1–6: En patolog fick värdet 0, den andra fick 1+ och den tredje fick värdet 2+.

Prov 7 och 8: En patolog fick värdet 0, den andra fick 2+ och den tredje fick värdet 2+.

Nedan redovisas en tabell över intervallet för procentöverenskomelser mellan par av patologer (tre par för varje kohort).

Tab. 42. Områden med 2X2*-överensstämmelse för de tre patologerna.

	Övergripande överensstämmelse i procent	Positiv överensstämmelse i procent	Negativ överensstämmelse i procent
Klon 4B5 mot PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antikropp			
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 %
Klon 4B5 mot 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 anti-HER2 (CB11)-antikropp mot 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+ = Negativ. 2+ och 3+ = Positiv.

Slutsats: Denna studie visade att det finns en kliniskt signifikant överensstämmelse (övergripande överensstämmelse mellan positiva/negativa resultat) mellan klon 4B5-

analysen och PATHWAY anti-HER2 (CB11)-analysen, vilket därmed visar att HER2 klon 4B5 är ett acceptabelt alternativ till CB11-antikroppen för att använda vid bedömning av bröstcancerpatienter för vilka behandling med trastuzumab (Herceptin) övervägs. Denna studie visade att HER2-uttrycksresultat som inhämtats från klon 4B5 IHC-analysen är jämförbara med HER2-genstatusresultat som fastställts genom FISH-analys.

Jämförelse av Klon 4B5 och HercepTest vid human gastrisk cancer:

En blindad, extern studie utfördes för att jämföra färgningsprestandan hos klon 4B5 på BenchMark XT-instrumentet med prestandan hos Dako HercepTest. Två kohorter med prover studerades, (1) nyligen konstruerade vävnadsmikroarrayer (TMA) som innehöll 248 fall av gastrisk cancer (sex fall konstaterades senare vara duplikat och avlägsnades), och (2) en delmängd av 183 kliniska testprover från prövningen Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA) Trial som undersökte HER2-status och kliniskt resultat hos patienter som behandlades med Herceptin (trastuzumab). Laboratoriet färgade fallen med klon 4B5 och HercepTest. Sammanlagt 431 fall var utvärderingsbara i båda analyserna och togs med i jämförelsen. En patolog värderade fallen enligt skalan 0/1+, 2+ och 3+. Positiva fall har värdena 2+ och 3+, medan negativa fall har värdena 0 och 1+. Tab. 43 Visar överensstämmelsegrader mellan klon 4B5 och HercepTest, för båda kohorterna som studerades.

Tab. 43. Överensstämmelsedata för klon 4B5 (IHC) jämfört med HercepTest vid gastrisk carcinom.

Vävnadskälla	Övergripande överensstämmelse i procent (95 % CI)	Positiv överensstämmelse i procent (95 % CI)	Negativ överensstämmelse i procent (95 % CI)
TMA ^a och ToGA ^b	91.0 (87.7–93.4)	82.1 (70.2–90.0)	92.4 (89.1–94.8)
n	362/398	46/56	316/342

IHC-resultaten ansågs som antikroppspositiva (2+ och 3+) och -negativa (0+ och 1+).

^a TMA: vävnadsprover i mikroarray

^b ToGA: kliniska testprover från ToGA-prövningen

Metodjämförelse med registreringsanalys för studier av PERJETA (pertuzumab) och KADCYLA (trastuzumab emtansin) vid bröstcancer

Motsvarighet till registreringsanalyser för kohorter från studier av PERJETA och KADCYLA fastställdes genom färgning av testprover med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikroppsanalys. 2753 prover som utvärderats för en PERJETA-prövning och 99 prover som utvärderats för en KADCYLA-prövning färgades med VENTANA anti-HER2 (4B5)-antikropp. Överensstämmelsegrader (PPA, NPA och OPA) fastställdes. 95 % CI (2-sidigt 95 % konfidensintervall) beräknades med score-metoden.

Tab. 44. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analyser vad gäller HER2-status för alla HER2-utvärderingsbara objekt. IHC-utvärderingsbara objekt har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både Klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

		Dako HER2-status ^{a,b}		
Studie	Klon 4B5-värde ^b	Positivt	Negativt	Totalt
PERJETA och KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Totalt	2558	272	2830
	Positivt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2380/2558 (93.0) (92.0–94.0)		
	Negativt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	257/272 (94.5)		

		Dako HER2-status ^{a,b}		
Studie	Klon 4B5-värde ^b	Positivt	Negativt	Totalt
	procent n/N (%) (95 % CI)	(91.1–96.6)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2637/2830 (93.2) (92.2–94.1)		

^a Positiv = IHC-positiv och/eller ISH-amplifierad. Negativ = IHC-negativ och ej ISH-amplifierad eller ISH-icke-amplifierad och ej IHC-positiv.

^b IHC: Positiv = 3+; Negativ = 0, 1+ eller 2+.

Tab. 45. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analyser med avseende på IHC-status för alla IHC-utvärderingsbara objekt. IHC-utvärderingsbara objekt har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både Klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

		Dako HercepTest-status ^a		
Studie	Klon 4B5-status ^a	Positivt	Negativt	Totalt
PERJETA och KADCYLA	Positivt	2330	65	2395
	Negativt	21	414	435
	Totalt	2351	479	2830
	Positivt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2330/2351 (99.1) (98.6–99.4)		
	Negativt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	414/479 (86.4) (83.1–89.2)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2744/2830 (97.0) (96.3–97.5)		
PERJETA	Positivt	2267	63	2330
	Negativt	10	399	409
	Totalt	2277	462	2739
	Positivt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2267/2277 (99.6) (99.2–99.8)		
	Negativt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	399/462 (86.4) (82.9–89.2)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	2666/2739 (97.3) (96.7–97.9)		
KADCYLA	Positivt	63	2	65
	Negativt	11	15	26
	Totalt	74	17	91

		Dako HercepTest-status ^a		
Studie	Klon 4B5-status ^a	Positivt	Negativt	Totalt
	Positivt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	63/74 (85.1) (75.3–91.5)		
	Negativt överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	15/17 (88.2) (65.7–96.7)		
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	78/91 (85.7) (77.1–91.5)		

^a Positiv = 3+; Negativ = 0, 1+ eller 2+.

Tab. 46. Överensstämmelse för Klon 4B5- och Dako-analyser med avseende på IHC-värde för alla IHC-utvärderingsbara objekt. IHC-utvärderingsbara objekt har HER2-statusen Positiv eller Negativ som fastställts av både Klon 4B5 och IHC-analysen för registrering.

		Dako HercepTest-värde			
Studie	Klon 4B5-värde	3+	2+	0/1+	Totalt
PERJETA och KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Totalt	2351	325	154	2830
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	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
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	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

		Dako HercepTest-värde			
Studie	Klon 4B5-värde	3+	2+	0/1+	Totalt
	Övergripande överensstämmelse i procent n/N (%) (95 % CI)	74/91 (81.3) (72.1–88.0)			

Tab. 47. Färgningsacceptans för Klon 4B5. IHC-testade objekt. IHC-färgning anses acceptabel om ett giltigt IHC-värde (0, 1+, 2+ eller 3+) kunde fastställas. Orsaker till ej acceptabel färgning omfattar oacceptabel negativ kontroll, förlust av vävnad, otillräcklig tumör, oacceptabel bakgrund och oacceptabel morfologi.

Parameter	PERJETA	KADCYLA	PERJETA och KADCYLA
Antal initiala IHC-tester	2753	99	2852
Initial färgningsacceptans 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)
Antal upprepade IHC-tester	40	0	40
Slutlig färgningsacceptans 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)

FELSÖKNING

- Om den positiva kontrollen uppvisar svagare färgning än väntat, ska andra positiva kontroller som körts i samma instrumentkörning, kontrolleras för att avgöra om det beror på primärantikroppen eller en av de vanliga sekundära reagenserna.
- Kontrollera att objektglaset har rätt streckkodsetikett om den positiva kontrollen är negativ. Om objektglaset är märkt ordentligt, ska andra positiva kontroller som körts i samma instrumentkörning kontrolleras för att avgöra om det beror på primärantikroppen eller en av de vanliga sekundära reagenserna. Vävnader kan ha samlats in på fel sätt, fixerats eller avparaffinerats. Rätt procedur för insamling, lagring och fixering ska följas.
- Om allt paraffin inte har tagits bort kanske det inte finns någon färgning. Avparaffineringen ska upprepas.
- Om specifik antikropps-färgning är för intensiv, ska körningen upprepas med inkuberingstiden för primärantikroppen förkortad tills önskad färgningsintensitet har uppnåtts.
- Om vävnadssnitt sköljs av objektglaset, bör objektglasen kontrolleras för att säkerställa att de är positivt laddade.
- Om nukleär och cytoplasmisk färgning förekommer i normal slemhinna i närheten av tumörområdet vid gastriskt karcinom och försvårar tolkningen av membranfärgning kan fallet testas med ISH.
- För korrigerande åtgärd, se avsnittet Färgningsprocedur eller instrumentets bruksanvisning, eller så kan du kontakta din lokala supportrepresentant.

REFERENSER

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

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, Egr, 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 (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.
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. Nadjji 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.

ANTECKNING: Punkt (hel punkt/stopp) används alltid i detta dokument som decimalavskiljare för att markera gränsen mellan heltal och bråkdelar i ett decimaltal. Tusentalsavgränsare används inte.

Sammanfattning av säkerhet och prestanda finns här:

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

Symboler

Ventana använder följande symboler och tecken utöver de som anges i standarden ISO 15223-1 (för USA: se [dialog.roche.com](https://www.roche.com) för definition av använda symboler):



Globalt artikelnummer



Unik enhetsidentifiering



Anger den enhet som importerar den medicintekniska produkten till Europeiska unionen

REVISIONSHISTORIK

Rev.	Uppdateringar
D	Uppdateringar till avsnitten Avsedd användning, Sammanfattning och förklaring, Klinisk signifikans, Principer för proceduren, Medföljande material, Nödvändigt material som inte medföljer, Provberedning, Varningar och försiktighetsåtgärder, Procedurer för kvalitetskontroll, Positiv vävnadskontroll, Färgningsresultat/förväntade resultat, Analytisk prestanda, Referenser. Tillägg av BenchMark ULTRA PLUS.

IMMATERIELL EGENDOM

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* och logotypen VENTANA är varumärken som tillhör Roche. Alla övriga varumärken tillhör sina respektive ägare.

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

KONTAKTUPPGIFTER

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

www.roche.com

