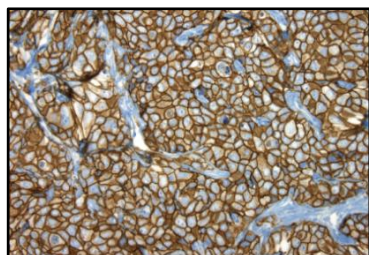


PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-2991

05278368001

IVD  50



Figur 1. PATHWAY HER2 (4B5)-antistofffarging i brystkarsinom.

TILTENKT BRUK

Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5)) er et monoklonalt antistoff fra kanin beregnet på laboratoriebruk for semikvantitativ påvisning av HER2-antigen i snitt av formalinfiksert parafininnstøpt normalt og neoplastisk vev etter farging på et BenchMark IHC/ISH-instrument. Det er indisert som et hjelpemiddel ved

vurderingen av brystkreftpasienter der behandling med Herceptin® (trastuzumab) eller KADCYLA® (ado-trastuzumabemtansin) vurderes.

Dette produktet skal tolkes av en kvalifisert patolog i sammenheng med en histologisk undersøkelse, relevant klinisk informasjon og egnede kontroller.

Dette antistoffet er beregnet til in vitro-diagnostisk bruk (IVD).

Merknad: Alle pasientene i de kliniske Herceptin-studiene ble valgt basert på en klinisk studieanalyse. Ingen av pasientene i disse studiene ble valgt ved hjelp av PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5). PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) ble sammenlignet med PATHWAY HER-2 (clone CB11) Primary Antibody på et uavhengig prøvesett og funnet å gi akseptable samsvarende resultater. Den faktiske korrelasjonen mellom PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) og klinisk resultat er ikke fastslått.

SAMMENDRAG OG FORKLARING

PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff) er et monoklonalt antistoff fra kanin produsert mot det interne domenet på den transmembrane, humane epidermal vekstfaktorreseptor 2 (HER2). HER2 ble klonet og karakterisert av Akiyama, et al i 1986.¹ Clone 4B5 er funnet å reagere med et 185 kD-protein fra SK-BR-3-cellelysater via Western blotting. SK-BR-3 er en brystkarsinomcellelinje, som har en 128-folds overuttrykk av HER2 mRNA.² Størrelsen på det identifiserte båndet korrelerer godt med det Akiyama et al har rapportert for HER2-protein (185 kD).¹ Immunhistokjemi (IHC)-forsøk med transfekterte cellelinjer (HEK293) har vist at Clone 4B5 farger celler transfektet med HER2 og celler transfektet med HER4. Ingen farging av celler transfektet med HER1 eller HER3 ble observert. Western blot-data med rekombinant HER4-protein indikerte også at Clone 4B5 gjenkjenner et HER4-epitop.

HER2 er en ca. 185 kDa transmembran reseptortyrosinkinase som strukturelt tilsvarer epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR).^{3,4} Genamplifisering og det tilsvarende overuttrykket av HER2 er funnet i en rekke tumorer, herunder brystkarsinomer.^{3,4,5} Proteinoveruttrykk på grunn av amplifisering av HER2-genet er den primære driveren av HER2-mediert tumorigenese.³ Overskytende HER2-proteinuttrykk ved celledisjunksjonen øker signaltransduksjonen, noe som oppregulerer proliferasjon og differensiering og til slutt forårsaker tumordannelse.^{3,4}

Mellom 15 og 30 prosent av invasive ductale krefttilfeller i brystet er positive for HER2-proteinoveruttrykk og/eller -genamplifisering.^{6,7} Nesten alle tilfeller av Pagets sykdom i brystet og opptil 90 prosent av tilfeller av ductalt karsinom in situ av komedo-type er positive.^{6,8}

KLINISK SIGNIFIKANS

Brystkreft er det vanligste karsinomet som oppstår hos kvinner, og den nest vanligste årsaken til kreftrelatert dødsfall.^{4,6} I Nord-Amerika er en kvinnes sannsynlighet for å få brystkreft én av åtte.⁴ Tidlig påvisning og relevante behandlinger kan vesentlig påvirke

total overlevelse.^{9,10} Små vevsprøver kan enkelt brukes i rutinemessig IHC, noe som gjør denne teknikken, i kombinasjon med antistoffer som påviser antigener som er viktige for karsinomtolkning, til et effektivt verktøy for patologen ved diagnostisering og prognostisering av sykdom. En viktig markør i brystkreft i dag er HER2.¹¹⁻¹⁴

De terapeutiske legemidlene Herceptin (trastuzumab) og KADCYLA (ado-trastuzumabemtansin/trastuzumabemtansin) har vist seg å være fordelaktige hos enkelte brystkarsinompasienter ved å stanse, og i noen tilfeller reversere, veksten av kreften.^{9,14} Legemidlene er humaniserte monoklonale antistoffer som binder til HER2-protein på kreftceller.^{11,13,14} Bare pasienter med HER2-positive brystkarsinomer har nytte av behandling med Herceptin eller KADCYLA.¹¹⁻¹⁴ In vitro-diagnostikk for evaluering av HER2-status i brystkarsinomer er viktig for å hjelpe helsepersonell med å bestemme behandling med Herceptin eller KADCYLA.^{11,12,14} IHC-basert påvisning av HER2-proteinuttrykk brukes som hjelpemiddel ved vurderingen av brystkreftpasienter der behandling med Herceptin eller KADCYLA vurderes.

Tolkning av resultatene fra hvilket som helst påvisningssystem for HER2 må ta hensyn til at HER2 uttrykkes i både brystkrefttumorer og friskt vev, men ved forskjellige nivåer og med forskjellige uttrykksmønstre.¹⁵ Histologiske vevspreparater har den fordel at de har intakt vevsmorfologi som hjelpemiddel til å tolke prøvens HER2-positivitet. Alle histologiske tester bør tolkes av en spesialist i brystkreftmorfologi og/eller -patologi, og resultatene må suppleres med morfologiske undersøkelser og passende kontroller og brukes i sammenheng med andre kliniske data og laboratoriedata.

PROSEDYREPRINSIPP

PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff er et monoklonalt antistoff fra kanin som binder til HER2 i formalinfikserte parafininnstøpte (FFPE) vevssnitt. Det spesifikke antistoffet kan lokaliseres av enten et biotinkonjugert sekundært antistoffpreparat som gjenkjenner immunglobuliner fra kanin, etterfulgt av tilsetning av et streptavidin-horseradish peroxidase (HRP)-konjugat (iVIEW DAB Detection Kit) eller et sekundært antistoff-HRP-konjugat (ultraView Universal DAB Detection Kit). Det spesifikke antistoff-enzym-komplekset visualiseres deretter med et presipiterende enzymreaksjonsprodukt. Hvert trinn inkuberes i en bestemt varighet og ved en bestemt temperatur. I slutten av hvert inkubasjonstrinn vasker instrumentet snittene for å stoppe reaksjonen og fjerne ubundet materiale som vil hindre ønsket reaksjon i påfølgende trinn. Instrumentet påfører Liquid Coverslip, som begrenser fordampning av de vandige reagensene fra prøveobjektglasset.

Kliniske kasus bør evalueres i sammenheng med ytelsen til egnede kontroller. Det anbefales at det også analyseres en positiv vevskontroll fiksert og prosessert på samme måte som pasientprøven (for eksempel et svakt positivt brystkarsinom). I tillegg til farging med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff skal et annet objektglass farges med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. For at testen skal anses som gyldig, må det positive kontrollvevet vise membranens farge i tumorcellene. Disse komponentene skal være negative når de er farget med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Det anbefales i tillegg at en negativ vevskontroll (for eksempel et HER2-negativt brystkarsinom) inkluderes for hver prøve-batch som prosesseres og kjøres på BenchMark IHC/ISH-instrumentet. Denne negative vevskontrollen bør farges med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff for å sikre at antigenforsterkningen og andre forbehandlingsprosedyrer ikke ga falskt positiv farging. Bruk av VENTANA forfortynnet PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og bruksklar iVIEW DAB og ultraView Universal DAB Detection Kits i kombinasjon med et BenchMark IHC/ISH-instrument reduserer risikoen for menneskelige feil og naturlig variabilitet som skyldes individuell reagensfortynning, manuell pipettering og manuell reagensapplikasjon.

MEDFØLGENDE MATERIALER

PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoffet inneholder tilstrekkelig reagens til 50 tester.

En 5 mL dispenser med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff inneholder ca. 30 µg med et monoklonalt antistoff fra kanin rettet mot humant HER2-antigen.

Antistoffet fortynnes i 0.05 M Tris-buffert saltvann, 0.01 M EDTA, 0.05 % Brij-35 med 0.3 % transportprotein og 0.05 % natriumazid, et konserveringsmiddel. Det er spor av føtal kalveserum, ca. 0.25 %, fra stamløsningen.

Spesifikk antistoffkonsentrasjon er ca. 6 µg/mL.

PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff er et IgG fra kanin forfortynnet fra vevskultursupernatanter.

Se riktig metodeark for VENTANA-deteksjonskit for den detaljerte beskrivelsen av: Prosedyreprinsipp, Materialer og metoder, Prøvetaking og klargjøring for analyse, Prosedyre for kvalitetskontroll, Feilsøking, Tolkning av resultater og Begrensninger.

MATERIALER SOM ER NØDVENDIGE, MEN SOM IKKE MEDFØLGER

Fargereagenser som VENTANA-deteksjonskit og tilleggskomponenter, inkludert objektglass med negativ og positiv vevskontroll, medfølger ikke.

Ikke alle produkter som er oppgitt i metodearket, er tilgjengelige i alle markeder. Kontakt lokal brukerstøtte.

Følgende reagenser og materialer vil kunne være påkrevd til farging, men følger ikke med:

1. Anbefalt kontrollvev
2. Objektglass for mikroskop, Superfrost Plus (VWR kat. nr. 48311-703 eller tilsvarende)
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (kat. nr. 760-1029 / 05266238001)
4. iVIEW DAB Detection Kit (kat. nr. 760-091 / 05266157001)
5. ultraView Universal DAB Detection Kit (kat. nr. 760-500 / 05269806001)
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 (ULTRA CC1) (kat. nr. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (kat. nr. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (kat. nr. 760-2037 / 05266769001)
14. Permanent monteringsmedium
15. Dekkglass
16. Automatisert dekkglassmaskin
17. Laboratorieutstyr til generelle formål
18. BenchMark IHC/ISH-instrument

OPPBEVARING OG STABILITET

Ved mottak og når det ikke er i bruk, må det oppbevares ved 2–8 °C. Skal ikke fryses.

For å sikre korrekt tilførsel av reagenser og stabilitet av antistoffet skal dispenserlokket settes på igjen og dispenseren umiddelbart settes i kjøleskapet i stående posisjon etter hver kjøring.

Hver antistoffdispenser har en utløpsdato. Når reagenset oppbevares på riktig måte, er det stabilt frem til datoen som står på etiketten. Reagenset skal ikke brukes etter utløpsdatoen.

KLARGJØRING AV PRØVEN

Rutinemessig prosesserte FFPE-vev egner seg for bruk med dette primære antistoffet når de brukes med VENTANA-deteksjonskit og BenchMark IHC/ISH-instrument. Objektglass skal farges umiddelbart, da antigenisitet for vevssnitt kan minke over tid. Det anbefalte vevsfiksativet er 10 % nøytralt bufret formalin.¹⁶ Den anvendte mengden er 15 til 20 ganger vevets volum. Ingen fiksativ vil trenge lenger inn i fast vev enn 2 til 3 mm eller lenger inn i porøst vev enn 5 mm i løpet av 24 timer. Et vevssnitt på 3 mm eller mindre bør fikseres i minst 4 timer og høyst 8 timer. Fiksering kan utføres ved romtemperatur (15–25 °C).¹⁶

Riktig fikserte og innstøpte vev som uttrykker antigenet, forblir stabile i minst 2 år hvis de oppbevares på et kjølig sted (15–25 °C). Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) fra 1988, 42CFR493.1259(b) krever at «Laboratoriet må oppbevare fargede objektglass i minst ti år fra undersøkelsesdatoen og lagre prøveblokker minst to år fra undersøkelsesdatoen».

Ca. 5 µm tykke snitt må skjæres og legges på objektglass. Objektglassene skal være Superfrost Plus eller tilsvarende. Vev bør lufttørkes ved å plassere objektglassene i omgivelsestemperatur over natten.¹⁷ Studier hos Ventana viser at lufttørkede, avskårne vevssnitt og cellelinjesnitt oppbevart ved 2–8 °C er stabile i opptil 6 måneder. Hvert laboratorium bør validere snittobjektglassenes stabilitet for sine egne prosedyrer og miljømessige oppbevaringsvilkår.

Det anbefales at positive og negative kontroller kjøres samtidig med ukjente prøver.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

1. Til in vitro-diagnostisk bruk (IVD).
2. Kun til profesjonell bruk.
3. **FORSIKTIG:** I USA begrenser føderal lov denne enheten til å selges av eller på bestilling fra en lege. (Rx Only)
4. **Skal ikke brukes utover det spesifiserte antallet tester.**

5. Positivt ladede objektglass kan være følsomme for miljøpåvirkning, noe som kan føre til feilaktig farging. Be Roche-representanten din om mer informasjon om hvordan du bruker disse objektglasstypene.
6. Materiale som stammer fra mennesker eller dyr, skal håndteres som smittefarlig biologisk materiale og kastes i henhold til korrekt prosedyre. Dersom en person har vært utsatt for slikt materiale, skal helsedirektivene fra myndighetene følges.^{18,19}
7. Unngå at reagenser kommer i kontakt med øyne og slimhinner. Hvis reagenser kommer i kontakt med sensitive områder, må du skylle med rikelige mengder vann.
8. Unngå mikrobiell kontaminasjon av reagenser, da det kan gi feil resultater.
9. Når dette produktet brukes i henhold til bruksanvisningen, er det ikke klassifisert som et farlig stoff. Konserveringsmiddelet i reagenset er natriumazid. Symptomer på overeksponering for natriumazid inkluderer hud- og øyeirritasjon, og irritasjon av slimhinner og øvre luftveier. Konsentrasjonen av natriumazid i dette produktet er 0.05 % og oppfyller ikke kriteriene for et farlig stoff. Opphopning av NaN₃ kan reagere med bly- og kobberør og danne svært eksplosive metallazider. Når slike væsker helles ut, må man alltid skylle med store mengder vann for å hindre opphopning av azid i avløpet.²⁰ Sensitive personer kan oppleve systemiske allergiske reaksjoner.
10. Hvis du vil ha mer informasjon om bruken av denne enheten, kan du se brukerhåndboken for BenchMark IHC/ISH-instrumentet og bruksanvisningen for alle nødvendige komponenter som finnes på dialog.roche.com.
11. Rådfor deg med lokale og/eller nasjonale myndigheter når det gjelder anbefalte metoder for avfallshåndtering.
12. Produktsikkerhetsmerking følger primært EU GHS-veiledningen. Sikkerhetsdataark er tilgjengelige for profesjonelle brukere på anmodning.
13. Hvis du trenger å rapportere mistenkte alvorlige hendelser knyttet til denne enheten, kontakter du den lokale Roche-representanten og den ansvarlige myndigheten i medlemslandet der brukeren holder til.

FARGINGSPROSEDYRE

VENTANA primære antistoffer er utviklet for bruk på BenchMark IHC/ISH-instrumenter sammen med VENTANA-deteksjonskit og -tilbehør. Se tabellene nedenfor for anbefalte fargeprotokoller. PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff er godkjent for bruk i USA når PATHWAY-fargingsprosedyre for anbefalte fargeprotokoller brukes.

Dette antistoffet er optimalisert for spesifikke inkubasjonstider, men brukeren må validere resultatene som oppnås med dette reagenset. PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff må stå minst 30 minutter ved romtemperatur før bruk.

Parameterne for de automatiserte prosedyrene kan vises, skrives ut og redigeres i henhold til prosedyren i instrumentets brukerhåndbok. Se aktuelt metodeark for VENTANA deteksjonskit for mer informasjon om IHC-fargingsprosedyrer.

For mer informasjon om riktig bruk av denne enheten, se metodearket for inline-dispenseren med P/N 790-2991.

Tabell 1. Anbefalt fargeprotokoll for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff med iVIEW DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter.

Prosedyretype	Metode		
	BenchMark	XT	ULTRA
Baking	Ingen	Ingen	Ingen
Avparafinisering	Valgt	Valgt	Valgt
Cellekondisjonering (Antigenavmaskering)	CC1, Standard	CC1, Standard	ULTRA CC1, Mild
Antistoff (primært)	32 minutter, 37 °C	32 minutter, 37 °C	24 minutter, 36 °C
A/B Blocking (Biotin Blocking)	Påkrevd		
Kontrastfarge	Hematoxylin II, 4 minutter		
Etter kontrastfarging	Bluing, 4 minutter		

Tabell 2. Anbefalt fargeprotokoll for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff med *ultraView* Universal DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter ved hjelp av PATHWAY-fargingsprosedyren.

Prosedyretype	Metode	
	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Fargingsprosedyre:	XT <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5	U <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5
Avparafinisering	Valgt	Valgt
Cellekondisjonering (Antigenavmaskering)	CC1, Mild	ULTRA CC1, mild
Enzym (protease)	Ingen påkrevd	Ingen påkrevd
Antistoff (primært)	16 minutter, 37 °C	12 minutter, 36 °C
Kontrastfarge	Hematoxylin II, 4 minutter	
Etter kontrastfarging	Bluing, 4 minutter	

Tabell 3. Anbefalt fargeprotokoll for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff med *ultraView* Universal DAB Detection Kit på BenchMark IHC/ISH-instrumenter ved hjelp av *ultraView*-fargingsprosedyren.

Prosedyretype	Metode	
	XT	ULTRA eller ULTRA PLUS
Fargingsprosedyre:	XT <i>ultraView</i> v3	U <i>ultraView</i> DAB
Avparafinisering	Valgt	Valgt
Cellekondisjonering (Antigenavmaskering)	Cell Conditioning 1, Mild	ULTRA CC1, mild
Enzym (protease)	Ingen påkrevd	Ingen påkrevd
Antistoff (primært)	16 minutter, 37 °C	12 minutter, 36 °C
ultraWash	Valgt	Valgt
Kontrastfarge	Hematoxylin II, 4 minutter	
Etter kontrastfarging	Bluing, 4 minutter	

På grunn av variasjonen i vevsfiksering og prosessering, og i generelle laboratorieinstrumenter og miljømessige betingelser, kan det være nødvendig å øke eller redusere inkubasjonen av primært antistoff, cellekondisjonering eller proteaseforbehandlingen, basert på individuelle prøver, påvisningen som brukes, og leserens preferanser. Mer informasjon om fikseringsvariabler finnes i «Immunohistochemistry Principles and Advances».²¹

PROSEDYRE FOR KVALITETSKONTROLL

Optimal laboratoriepraksis er å inkludere et positivt kontrollsnitt på samme objektglass som testvevet. Dette hjelper til med å identifisere eventuelle feil ved bruk av reagenser på objektglasset. Vev med svakt positiv farging vil være mer egnet for kvalitetskontroll. Kontrollvev kan inneholde både positive og negative fargeelementer og fungere som vev til både positiv og negativ kontroll. Kontrollvev bør være fra nylig foretatt obduksjon, biopsi eller kirurgiske prøver som er forberedt eller fiksert så snart som mulig på identisk måte som testsnittene.

Kjent positive vevskontroller bør kun benyttes for å overvåke ytelsen til reagenser og instrumenter, ikke som hjelpemiddel ved bestemmelse av spesifikk diagnostikk av testprøver. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser positiv farging, bør resultater med testprøven anses som ugyldige.

Eksempler på positive kontrollvev for dette antistoffet er svakt positivt brystkarsinomvev.

Cellelinjesystemkontroller

Ventana har tilgjengelig som et separat produkt fire formalinfikserte cellelinjekontroller innstøpt i parafin, snittet og plassert på et enkelt ladet objektglass (P/N 781-2991).

PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides kan være nyttig for en foreløpig validering av prosesseringsmetoden som brukes til å farge objektglass med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff. Disse fire cellelinjekontrollene er karakterisert ved in situ-hybridisering for genkopinumner, Tabell 4. Når cellelinjene behandles og farges riktig, skal de farges som beskrevet i metodearket for PATHWAY Her-2 4 in 1 Control Slide. Hvis den angitte fargingen ikke er åpenbar i de relevante kjernene, særlig 1+- og 2+-kontrollene, bør fargingen av vevene gjentas.

Tabell 4. Egenskaper ved PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

HER2 IHC-skår	Cellelinje	HER2/Chr17-forhold *
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

* HER2/Chr17-forhold er et gjennomsnitt av tre loter med PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides bestemt ved hjelp av fluorescerende in situ-hybridisering (FISH)

Positiv vevskontroll

Et positivt kontrollvev fiksert og prosessert på samme måte som pasientprøvene må kjøres for hvert sett med testbetingelser og med hver utført PATHWAY anti-HER2 (4B5) antistofffargingsprosedyre. Dette vevet kan inneholde både positive fargede celler / vevskomponenter og negative celler/vevskomponenter og kan fungere både som det positive og negative kontrollvevet. Kontrollvev bør være fra nylig foretatt obduksjons-/biopsi-/operasjonsprøver som forberedes og fikseres så snart som mulig på identisk måte som testsnittene. Slikt vev kan overvåke alle trinn i analysen, fra vevsklargjøring til farging. Bruk av et vevssnitt som er fiksert eller prosessert på en annen måte enn testprøven, gir kontroll for alle reagenser og metodetrinn bortsett fra fiksering og vevspreparering. Et vev med svakt positiv farging er mer egnet enn sterkt positiv farging for optimal kvalitetskontroll og for å påvise mindre nivåer av reagensdegradering. Ideelt sett bør et vev, som er kjent for å ha svak, men positiv farging, velges for å sikre at systemet er sensitivt for små mengder med reagensdegradering eller problemer med IHC-metoden. Generelt er imidlertid neoplastisk vev som er positivt for HER2, sterkt positivt på grunn av patologiens art (overtrykk). Et eksempel på en positiv kontroll for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff er et kjent, svakt HER2-positivt invasivt brystkarsinom (f.eks. duktalt eller lobulært). De positivt fargede vevskomponentene (membran i neoplastiske celler) brukes til å bekrefte at antistoffet ble brukt, og at instrumentet fungerte riktig.

Et kjent svakt HER2-positivt invasivt brystkarsinomvev kan inneholde både positive og negative fargede celler eller vevskomponenter og kan fungere både som det positive og negative kontrollvevet.

Kjente positive vevskontroller bør kun benyttes for å overvåke korrekt ytelse for prosesserte vev og testreagenser, og ikke som hjelpemiddel ved bestemmelse av spesifikk diagnostikk av pasientprøver.

Negativ vevskontroll

Det samme vevsobjektglasset som brukes til positiv vevskontroll (duktalt eller lobulært invasivt brystkarsinom), kan brukes som negativ vevskontroll. Komponentene som ikke farger (omkringliggende stroma, lymfoide celler og blodårer), bør vise fravær av spesifikk farging og gi en indikasjon på spesifikk bakgrunnsfarging med det primære antistoffet. Bruk et vev som er kjent å være fiksert, prosessert og innstøpt på en måte som er identisk med pasientprøven(e) med hver fargekjøring for å bekrefte spesifisiteten til PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff for å gi en indikasjon på spesifikk bakgrunnsfarging (falskt positiv farging).

Negativ reagenskontroll

En negativ reagenskontroll må kjøres for hver prøve som et hjelpemiddel i tolkning av resultatene. En negativ reagenskontroll brukes i stedet for det primære antistoffet for å evaluere ikke-spesifikk farging. Objektglasset bør farges med CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Inkubasjonsperioden for den negative reagenskontrollen skal være lik inkubasjonsperioden for det primære antistoffet.

Uforklarlige avvik

Uforklarlige avvik i kontroller skal rapporteres til lokal brukerstøtte umiddelbart. Hvis kvalitetskontrollresultatene ikke oppfyller spesifikasjonene, er pasientresultatene ugyldige. Se avsnittet Feilsøking. Identifiser og korreger problemet, og kjør deretter pasientprøvene på nytt.

Analysereverifisering

Før første bruk av et antistoff eller fargingssystem i en diagnostisk prosedyre skal spesifisiteten til antistoffet kontrolleres ved å teste det på en rekke vev med kjente immunhistokjemitytelsesegenskaper som representerer kjente positive og negative vev (se prosedyren for kvalitetskontroll som er skissert tidligere i denne delen av produktvedlegget, og anbefalingene for kvalitetskontroll fra College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²² eller CLSI Approved Guideline²³ eller begge dokumentene). Disse prosedyrene for kvalitetskontroll bør gjentas for hver ny antistofflot, eller når det er en endring i analyseparametere. Brystkreftvev med kjent HER2-status er egnet til analysereverifisering.

FARGINGSTOLKNING / FORVENTEDE RESULTATER

VENTANA automatisert immunfargeprosedyre gjør at et brunfarget (DAB) reaksjonsprodukt danner presipitat på antigenstedene lokalisert med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff. En kvalifisert patolog med erfaring fra immunhistokjemiske prosedyrer må evaluere kontrollene og kvalifisere det fargede produktet før resultatene tolkes.

Positive kontroller

Den fargede positive vevskontrollen bør undersøkes først for å sikre at alle reagenser fungerer som de skal. Forekomst av et hensiktsmessig farget reaksjonsprodukt i målcellenes membran tyder på positiv reaktivitet. Avhengig av inkubasjonstid og styrken til det anvendte hematoksylinet vil kontrastfarge resultere i en blek til mørk blå farging av cellekjerner. Kraftig eller ufullstendig kontrastfarge kan hindre riktig tolkning av resultater.

Hvis de positive vevskontrollene ikke viser riktig positiv farging, bør alle resultater med testprøvene anses som ugyldige.

Negative vevskontroller

Den negative vevskontrollen skal undersøkes etter den positive vevskontrollen for å verifisere det primære antistoffets spesifikke merking av målantigenet. Fravær av spesifikk farging i den negative vevskontrollen bekrefter manglende antistoff-kryssreaktivitet til celler eller cellekomponenter. Hvis vevet er kontrastfarget, kan det være farging rundt utsiden av cellen, dvs. de interstitielle rommene. Hvis det forekommer spesifikk farging i den negative vevskontrollen, skal resultater med pasientprøven betraktes som ugyldige.

Negative reagenskontroller

Ikke-spesifikk farging, hvis dette forekommer, har diffust utseende. Sporadisk lys farging i bindevev vil også kunne observeres i vevssnitt som er fiksert i for mye formalin. Intakte celler bør brukes til tolkning av fargingsresultater, siden nekrotiske eller degenererte celler ofte gir ikke-spesifikk farging.

Pasientvev

Pasientprøver skal undersøkes sist. Positiv fargingsintensitet bør evalueres i sammenheng med bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. Som med alle immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at det aktuelle antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet er fraværende i cellene eller vevet som ble analysert. Morfologien til hver vevsprøve bør også undersøkes ved å benytte et snitt som er farget med hematoksylin og eosin, ved tolkning av et immunhistokjemisk resultat. Pasientens morfologiske funn og relevante kliniske data må tolkes av en kvalifisert patolog.

En kvalifisert patolog som har erfaring fra immunhistokjemiske prosedyrer, må evaluere positive og negative kontroller og kvalifisere det fargede produktet før tolkning.

Skåringskonvensjoner for tolkningen av PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff

Brystkarsinomer som anses positive for HER2-proteinoveruttrykk, må oppfylle terskelkriterier for fargingsintensitet (2+ eller mer på en skala fra 0 til 3+) og prosentvis positive tumorceller (mer enn 10 %). Farging må også lokaliseres til cellemembranen. Cytoplasmisk farge kan fortsatt være til stede, men denne fargingen er ikke inkludert i bestemmelsen av positivitet. Den velkonserverte og velfargede regionen av vevet bør undersøkes for fargingsintensitet og bestemmelse av membranfargens fullstendighet. Farging som fullstendig omslutter den cytoplasmiske membranen, bør skåres som en intensitet på «2+» eller «3+». Delvis farging av membranen bør skåres som «1+». Det kan være nødvendig å undersøke grensekasus ved 40x eller høyere forstørrelse for å skille mellom intensiteter på «1+» og «2+». I motsetning til kasus skåret som en intensitet på 3+ har fargingen skåret som 2+ en skarper og mer klart avgrenset ring, mens kasus skåret som 3+ viser en svært tykk kontur. Nedenfor er et hurtigreferansediagram for fargingskriterier, Tabell 5. Se Tolkningsveiledning for PATHWAY anti-HER2 (4B5) Rabbit

Monoclonal Primary Antibody for en mer detaljert beskrivelse med bilder av farging med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff.

Tabell 5. Kriterier for intensitet og mønster på cellemembranfarge med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff.

Fargemønster	Skår (rapport til behandelende lege)	Fargevurdering av HER2
Ingen membranfarge observeres	0	Negativ
Svak, delvis farging av membranen i hvilken som helst del av kreftcellene	1+	Negativ
Svak fullstendig farging av membranen, mer enn 10 % av kreftcellene	2+	Svakt positiv *
Intens fullstendig farging av membranen, mer enn 10 % av kreftcellene	3+	Positiv

* Anbefal refleks til ISH

BEGRENSNINGER

Generelle begrensninger

- Immunhistokjemi er en diagnostisk prosess med flere trinn som forutsetter spesialisert opplæring i valg av riktige reagenser, vevsalternativer, fiksering, prosessering, klargjøring av objektglasset til immunhistokjemi og tolkning av fargingsresultatene.
- Vevsfarging er avhengig av håndteringen og prosesseringen av vevet før farging. Feil fiksering, frysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminasjon med annet vev eller andre væsker kan frembringe artefakter, antistoffansamling eller falskt negative resultater. Inkonsekvante resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder, eller fra uregelmessigheter i vevet.
- Kraftig eller fullstendig kontrastfarge kan hindre riktig tolkning av resultater.
- Klinisk tolkning av positiv farging, eller fraværet av dette, må evalueres i lys av sykehistorie, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Klinisk tolkning av farging, eller fraværet av dette, må suppleres med morfologiske undersøkelser og riktige kontroller i tillegg til andre diagnostiske tester. Det er en kvalifisert patologs ansvar å være kjent med antistoffene, reagensene og metodene som brukes til å tolke det fargede preparatet. Farging må utføres i et sertifisert, lisensiert laboratorium under tilsyn av en patolog som er ansvarlig for gjennomgang av de fargede objektglassene, og som kontrollerer at de positive og negative kontrollene er tilstrekkelige.
- VENTANA-antistoffer og -reagenser leveres optimalt fortynnet til bruk når den medfølgende veiledningen overholdes. Alle avvik fra anbefalte testprosedyrer kan gjøre forventede resultater ugyldige. Egnede kontroller må implementeres og dokumenteres. Brukere som avviker fra anbefalte testprosedyrer, må ta ansvar for tolkning av pasientresultater.
- Dette produktet er ikke beregnet på bruk i flowcytometri, da ytelsesegenskaper ikke er fastslått.
- Reagenser kan fremvise uventede reaksjoner i vevstyper som ikke har vært testet tidligere. Muligheten for uventede reaksjoner selv i testede vevsgrupper kan ikke elimineres helt på grunn av biologisk variabilitet av antigenekspresjon i neoplasmer, eller andre patologiske vev.²⁴ Kontakt lokal brukerstøtte med dokumenterte uventede reaksjoner.
- Vev fra personer som er smittet med hepatitt B-virus, som inneholder hepatitt B-overflateantigen (HBsAg), kan vise ikke-spesifikk farging med pepperrotperoksidase.²⁵
- Falskt positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk proteinbinding eller substratreaksjonsprodukter. De kan være forårsaket av pseudoperoxidase-aktivitet (erytrocytter), endogen peroksidaseaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (eksempel: lever, hjerne, bryst, nyre) avhengig av hvilken type immunfarge som brukes.²⁶
- Som med alle immunhistokjemitestet betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i cellene eller vevet som ble analysert.

SPESIFIKKE BEGRENSNINGER

Dette antistoffet er optimalisert som angitt i Tabell 1, Tabell 2 og Tabell 3 for BenchMark IHC/ISH-instrumenter og -påvisningskjemier. På grunn av variasjonen i vevsfiksering og prosessering kan det være nødvendig å øke eller redusere inkubasjonstiden for primært antistoff på individuelle prøver. For mer informasjon om fikseringsvariabler, se «Immunohistochemistry Principles and Advances».²¹

Når antistoffet brukes i kombinasjon med VENTANA-deteksjonskit og tilbehør, påviser det antigen som overlever rutinemessig formalinfiksering, vevsprosessering og snitting.

Brukere som avviker fra anbefalte testprosedyrer, er ansvarlige for tolkning og validering av pasientresultater.

Objektglassene bør farges raskt, da antigenisiteten av de avskårne vevssnittene kan reduseres over tid og være utsatt på grunn av miljøfaktorer ved lagring over lengre tid.

Alle analyser vil kanskje ikke registreres på hvert instrument. Kontakt den lokale Roche-representanten for mer informasjon.

YTELSESEGNSKAPER

ANALYTISK YTELSE

Det ble gjennomført fargingstester for sensitivitet, spesifisitet og presisjon, og resultatene er oppført nedenfor.

Sensitivitet og spesifisitet

PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoffets sensitivitet/spesifisitet ble bestemt av en studie som ikke viste noen spesifikk membranfarge for de fleste normale vev. Fargingsresultater vises i Tabell 6. PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoffets sensitivitet/spesifisitet ble også bestemt av en studie som ikke viste noen spesifikk membranfarge i de fleste neoplastiske vev. Fargingsresultater vises i Tabell 7. Farging for spesifisitet og sensitivitet ble utført ved hjelp av iVIEW DAB Detection Kit-protokollen på et BenchMark XT-instrument eller *ultraView*-protokollen på et BenchMark ULTRA-instrument angitt ovenfor.

Positiv farging i mandelepitel, øsofagealt epitel, prostata, perifer nerve, biskjoldbruskkjertel, brystkreft, kolon og eggstokkreft er i samsvar med publisert litteratur når det gjelder uttrykk av HER2.

Sensitivitet avhenger av konserveringen av antigenet. All feil vevshåndtering under fiksering, snitting, innstøping eller oppbevaring som endrer antigenisiteten, vil svekke HER2-proteinpåvisning med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og kan generere falskt negative resultater.

Tabell 6. Sensitiviteten/spesifisiteten til PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff ble bestemt ved å teste normale FFPE-vev.

Vev	Ant. positive/ totale kasus	Vev	Ant. positive/ totale kasus
Cerebrum	0/6	Tynntarm	0/6
Cerebellum	0/6	Kolon	0/46
Binyre	0/6	Lever	0/6
Eggstokk	0/6	Spyttkjertel	0/3
Bukspyttkjertel	0/6	Tunge	0/3
Lymfeknute	0/12	Nyre	0/6
Hypofyse	0/5	Prostata	1/6
Testis	0/6	Blære ^b	3/3
Tyreoid	0/6	Rektum	0/6
Bryst	0/14	Biskjoldbruskkjertel ^c	4/6
Milt	0/6	Endometrium	0/3
Tonsill ^a	3/6	Livmor	0/3
Tymus	0/5	Livmorhals	0/5
Beinmarg	0/3	Endocervix	0/1

Vev	Ant. positive/ totale kasus	Vev	Ant. positive/ totale kasus
Lunge	0/6	Skjelettmuskel	0/6
Hjerte	0/5	Hud	0/6
Perikard	0/3	Nerve	2/6
Spiserør	1/6	Mesotel	0/3
Mage	0/11		

^a fokal farge for overflateepitelceller

^b membranøs farge for overflatiske paraplyceller

^c fokal membranfarge

Tabell 7. Sensitiviteten/spesifisiteten til PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff ble bestemt ved å teste en rekke neoplastiske FFPE-vev.

Patologi	Ant. positive/totale kasus
Glioblastom (cerebrum)	0/2
Meningeom (cerebrum)	0/1
Oligodendrogliom (cerebrum)	0/1
Serøst adenokarsinom (eggstokk)	0/2
Karsinom, ikke ellers angitt (NOS) (eggstokk)	1/2
Nevroendokrin neoplasme (bukspyttkjertel)	0/1
Adenokarsinom (bukspyttkjertel)	0/1
Karsinom, NOS (bukspyttkjertel)	0/3
Seminom (testikkel)	0/1
Embryonalt karsinom (testikkel)	0/1
Medullært karsinom (skjoldbruskkjertel)	0/1
Papillært karsinom (skjoldbruskkjertel)	0/1
Karsinom, NOS (skjoldbruskkjertel)	0/3
Mikroinvasivt duktalt karsinom (bryst)	2/2
Invasivt duktalt karsinom (bryst)	42/99
Karsinom, NOS (bryst)	1/4
Småcellet karsinom (lunge)	0/1
Plateepitelkarsinom (lunge)	0/1
Adenokarsinom (lunge)	0/1
Karsinom, NOS (lunge)	0/2
Plateepitelkarsinom (spiserør)	0/1
Adenokarsinom (spiserør)	0/1
Mucinøst adenokarsinom (mage)	0/4
Adenokarsinom (mage)	8/88
Signetringcellekarsinom (mage)	0/4

Patologi	Ant. positive/totalt kasus
Karsinom, NOS (mage)	0/3
Adenokarsinom (tynntarm)	0/1
Gastrointestinal stromal tumor (tynntarm)	0/1
Adenokarsinom (kolon)	0/32
Gastrointestinal stromal tumor (kolon)	0/1
Karsinom, NOS (kolon)	1/3
Adenokarsinom (rektum)	1/5
Gastrointestinal stromal tumor (rektum)	0/1
Melanom (rektum)	0/1
Hepatocellulært karsinom (lever)	0/3
Hepatoblastom (lever)	0/1
Karsinom, NOS (lever)	0/3
Klarcellet karsinom (nyre)	0/1
Karsinom, NOS (nyre)	0/5
Adenokarsinom (prostata)	0/2
Karsinom, NOS (prostata)	0/3
Leiomyom (livmor)	0/1
Adenokarsinom (livmor)	0/1
Klarcellet karsinom (livmor)	0/1
Plateepitelkarsinom (livmorchals)	0/2
Embryonalt rabdomyosarkom (tverrstripet muskel)	0/1
Basalcellekarsinom (hud)	0/1
Plateepitelkarsinom (hud)	1/1
Nevrofibrom (korsrygg)	0/1
Nevroblastom (retroperitoneum)	0/1
Mesoteliom (peritoneum)	0/1
Pleomorft rabdomyosarkom (peritoneum)	0/1
Lymfom, NOS	0/3
B-cellelymfom, NOS (milt)	0/1
B-cellelymfom, NOS (lymfeknute)	0/2
Hodgkins lymfom (lymfeknute)	0/1
Urotelialt karsinom (blære)	1/1
Leiomyosarkom (blære)	0/1
Osteosarkom (bein)	0/1
Leiomyosarkom (glatt muskel)	0/1
Adenokarsinom i rektum (metastatisk)	0/1

Patologi	Ant. positive/totalt kasus
Kolonadenokarsinom (metastatisk)	0/7
Mucinøst adenokarsinom i kolon (metastatisk)	0/1
Nevroendokrin neoplasme, NOS	0/2
Leiomyom	0/2
Melanom	0/2
Sarkom, NOS	0/2
Udifferensiert karsinom, NOS	0/1

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Studier av repeterbarhet og intermedier presisjon

Reproduserbarhet innenfor samme kjøring for farging på BenchMark XT-instrumentet ble bestemt ved farging av tre objektglass hver med fem brystkreftvev med en skår på 0, 1+, 2+ og 3+ HER-2-uttrykk. For hvert kasus farget tre av 3 objektglass riktig innenfor samme kjøring og for alle testede instrumenter. Brukere skal verifisere reproduserbarhetsresultater innenfor kjøring ved å farge flere sett av serielle snitt med lav, medium og høy antigenitet i en enkeltkjøring.

Reproduserbarhet mellom kjøringer og mellom plattformer for farging ble bestemt ved farging av tre objektglass hver med fem brystkreftvev med skår på 0, 1+, 2+ og 3+ HER-2-uttrykk på tre forskjellige instrumentkjøringer på BenchMark XT-instrumentet. For hvert kasus farget 9 av 9 objektglass riktig mellom tre instrumentkjøringer og mellom alle testede instrumenter. Brukere skal verifisere reproduserbarhetsresultater mellom kjøringer ved å farge flere sett med serielle snitt med lav, middels og høy antigenitet på forskjellige dager.

Reproduserbarhet mellom loter

Reproduserbarhet mellom loter ble bestemt ved automatisert farging av 5 brystkreftvev med skår på 0, 1+, 2+ og 3+ HER2-uttrykk med 3 loter med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff. Fargede vev ble skåret på en skala fra 0 til 3+ av tre kvalifiserte lesere. Det var 100 % samsvar mellom loter og lesere for de 3 objektglassene og 5 vevene som ble farget.

Reproduserbarhetsstudier mellom laboratorier og mellom lesere på BenchMark XT-instrumentet

BenchMark XT-instrumentet reproduserbarhet av farging mellom laboratorier og skåring mellom lesere: Tre laboratorier, fra separate institusjoner i USA, deltok i studien av reproduserbarhet mellom laboratorier. Objektglass med 40 nøytralt bufrede formalinfikserte invasive brystkarsinomkasus [10 hver fra hver HER-2-kategori (0–1+, 2+, 3+)] og seks (6) PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides ble sendt til hvert av studiestedene for farging på et BenchMark XT-instrument ved hjelp av den anbefalte fargeprotokollen. Kontrollene omfattet PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andre objektglass fra hvert kasus farget med negativt Ig-reagens. Ingen studiesteder opplevde ugyldige kjøringer, basert på kontrollenes ytelse. Resultatene ble analysert av Ventana. Trettifire av førti (34/40) objektglass viste lignende fargingsintensitet på tvers av fargingssteder. Seks prøver (6/40 eller 15 %) varierte med høyst 1 intensitetsnivå. Tre (3/6) prøver varierte mellom 0 og 1+, som begge anses å være negative. To prøver (2/40 eller 5 %) varierte mellom 2+ og 3+, og én prøve (1/40) varierte mellom 1+ og 2+. I alle de 40 kasusene (100 %) var minst 2 av 3 patologer enige.

Ytelseegenskaper på BenchMark ULTRA-instrument ved bruk av VIEW DAB Detection Kit og *ultra*View Universal DAB Detection Kit.

BenchMark ULTRA-instrumentets reproduserbarhet ved farging mellom laboratorier og mellom dager

Tre laboratorier, fra separate institusjoner i USA, deltok i studien av reproduserbarhet mellom laboratorier. Objektglass med 48 FFPE invasive brystkarsinomkasus [12 hver fra hver HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] og 1 par med PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides for hver av 12 fargekjøringer ble distribuert til studiestedene for farging på et BenchMark ULTRA-instrument ved bruk av den anbefalte fargeprotokollen og *ultra*View Universal DAB Detection Kit. Kontroller omfattet PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andre

objektglass fra hvert kasus farget med negativt Ig-reagens. Patologer, blindet til kasusstatus, evaluerte objektglassene og leverte en klinisk skår (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultatene ble analysert av Ventana. Ved bruk av standard nomenklatur for 2 x 2-tabeller ble gjennomsnittlig positivt samsvar (APA) på tvers av studiesteder beregnet som $[2a/(2a+b+c)]$ og gjennomsnittlig negativt samsvar (ANA) ble beregnet som $[2d/(2d+b+c)]$. På tvers av alle studiesteder var APA mellom studiesteder basert på klinisk vurdering (positiv, negativ) 90.0 % (108/120), og ANA var 92.9 % (156/168). For parvise sammenligninger av studiesteder ble APA beregnet som $a/(a+c)$, og ANA ble beregnet som $d/(b+d)$. APA-ratene mellom studiesteder var 93.0 % (40/43), 87.2 % (34/39) og 89.5 % (34/38) for henholdsvis studiested A vs. studiested B, studiested A vs. studiested C og studiested B vs. studiested C. ANA-ratene mellom studiesteder var 94.3 % (50/53), 91.2 % (52/57) og 93.1 % (54/58) for henholdsvis studiested A vs. studiested B, studiested A vs. studiested C og studiested B vs. studiested C.

Følgende Tabell 8, Tabell 9 og Tabell 10 er 3 x 3-presentasjoner av resultater for hver leser basert på klinisk resultat hvor 2+ og 3+ ble separert:

Tabell 8. 3 x 3-analyse av samsvarsrater mellom laboratorier for studiested A vs. studiested B – PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Studiested A	Studiested 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
Totalt samsvar i prosent (OPA): n/N (%)			43/48 (89.6)	

Tabell 9. 3 x 3-analyse av samsvarsrater mellom laboratorier for studiested A vs. studiested C – PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Studiested A	Studiested C			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Totalt	12	5	31	48
Totalt samsvar i prosent (OPA): n/N (%)			42/48 (87.5)	

Tabell 10. 3 x 3-analyse av samsvarsrater mellom laboratorier for studiested B vs. studiested C – PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA-instrument med *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Studiested B	Studiested C			
	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Totalt	12	5	31	48
Totalt samsvar i prosent (OPA): n/N (%)			44/48 (91.7)	

BenchMark ULTRA-instrumentets fargingsreproduserbarhet mellom dager

Den delen av studien som omfattet reproduserbarhet mellom dager (IDR), inkluderte 12 kasus med en tiltenkt fordeling av ca. tre (3) kasus på hver klinisk skår (0, 1+, 2+, 3+). De fem kjøringene på BenchMark ULTRA-instrumentet ved den ene institusjonen

(studiested C) som utførte IDR-delen av studien, fant i alt sted over minst 20 dager, slik at det aldri var to sammenhengende dager med farging. Både IDR APA- og ANA-ratene basert på klinisk vurdering av PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på sted C mellom alle dager var 100 %. Ratene for totalt samsvar i prosent (OPA) for sammenligninger mellom dager basert på klinisk skår var 100 % for hver av sammenligningene mellom dager og for alle dager kombinert.

Studier av reproduserbarhet mellom laboratorier og mellom lesere på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet ved hjelp av *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Tre laboratorier, fra separate institusjoner i USA, deltok i studien av reproduserbarhet mellom laboratorier. Avskårne objektglass med 28 FFPE-invasive brystkarsinomkasus [7 fra hver HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] og et par kontrollobjektglass (ett PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide og ett kasus med kontrollbrystkarsinomvev) for hver av 10 fargekjøringer ble fordelt på hvert studiested for farging på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved hjelp av den anbefalte fargeprotokollen og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontroller inkluderte PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, et kasus med kontrollbrystkarsinomvev og et andre objektglass med hvert testkasus farget med negativt Ig-reagens. Patologer, blindet til kasusstatus, evaluerte objektglassene og leverte en klinisk skår (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Resultatene ble analysert av Ventana.

Reproduserbarheten av HER2-status (positiv eller negativ) ble evaluert for alle evaluerbare kasusobjektglass ved hjelp av modal HER2-status på kasusnivå som referanse for hvert kasus. Ved beregning av samsvarsrater ble en HER2-skår på 0 eller 1+ ansett som negativ, og en HER2-skår på 2+ eller 3+ vurdert som positiv. Modal HER2-status for hvert kasus ble bestemt som det hyppigst observerte leserresultatet (positivt eller negativt) for det aktuelle kasuset. Alle observasjoner oppnådd ved gruppering av alle studiesteder, lesere, dager og kasus for hele den evaluerbare kasusobjektglasspopulasjonen ble sammenlignet mot de modale HER2-statusresultatene. PPA, NPA og OPA for den grupperte analysen var henholdsvis 97.9 % (411/420), 97.6 % (410/420) og 97.7 % (821/840). Reproduserbarhet av HER2-status ble også evaluert som APA-, ANA- og OPA-rater for alle mulige parvise sammenligninger mellom studiesteder og for alle kombinerte studiestedsammenligninger. For reproduserbarhet mellom studiesteder var APA, ANA og OPA henholdsvis 95.9 %, 95.9 % og 95.9 %. For reproduserbarhet mellom lesere var resultatene for APA, ANA og OPA 95.5 %, 95.5 % og 95.5 %. For reproduserbarhet mellom dager var APA, ANA og OPA 97.0 %, 97.0 % og 97.0 %. Tosidige 95 % CI-er ble beregnet ved hjelp av persentil bootstrap-metoden.

Tabell 11–14 viser disse resultatene.

Tabell 11. Gruppert samsvar for HER2-status med modalstatus på kasusnivå for brystkarsinomkasus farget med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

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

Tabell 12. Grupperte samsvarsrater for studiesteder for de parvise sammenligningene av HER2-status for brystkarsinomkasus farget med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

HER2-status fra studiested i	HER2-status fra studiested j		Totalt
	Positiv	Negativ	
Positiv	4037	163	4200
Negativ	183	4017	4200
Totalt	4220	4180	8400

HER2-status fra studiested i	HER2-status fra studiested j		Totalt
	Positiv	Negativ	
	n/N	% (95 % CI)	
Gjennomsnittlig positivt samsvar	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Gjennomsnittlig negativt samsvar	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Totalt samsvar i prosent	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Merknad: Studiested i og j er studiestedene (studiested A, studiested B og studiested C) som brukes i studien. Den grupperte samsvarsraten beregnes ved gruppering av all mulig sammenligning mellom alle studiesteder (studiested A vs. B, A vs. C og B vs. C).

Tabell 13. Grupperte samsvarsrater for mellom lesere for de parvise sammenligningene av HER2-status for brystkarsinomkasus farget med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

HER2-status fra leser 1	HER2-status fra leser 2		Totalt
	Positiv	Negativ	
Positiv	201	9	210
Negativ	10	200	210
Totalt	211	209	420
	n/N	% (95 % CI)	
Gjennomsnittlig positivt samsvar	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Gjennomsnittlig negativt samsvar	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Totalt samsvar i prosent	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Merknad: Leser 1 og 2 er leserne fra samme studiested (studiested A, studiested B eller studiested C) som brukes i studien. Den grupperte samsvarsraten beregnes ved gruppering av samsvar mellom lesere innenfor et studiested mellom alle studiesteder.

Tabell 14. Grupperte samsvarsrater mellom dager for de parvise sammenligningene av HER2-status for brystkarsinomkasus farget med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet.

HER2-status fra dag i	HER2-status fra dag j		Totalt
	Positiv	Negativ	
Positiv	817	15	832
Negativ	35	813	848
Totalt	852	828	1680
	n/N	% (95 % CI)	
Gjennomsnittlig positivt samsvar	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Gjennomsnittlig negativt samsvar	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Totalt samsvar i prosent	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Merknad: Dag i og j er dagene (dag 1 til dag 5) fra studiefargingsdagene. Den grupperte samsvarsraten beregnes ved gruppering av all mulig sammenligning mellom hvilke som helst to dager for hver leser fra hvert studiested.

Sammenligningsstudie mellom BenchMark ULTRA- og BenchMark XT-instrumentet

To fargingslaboratorier og tre avlesningssteder i USA deltok i plattformsammenligningsstudien. Objektglass med 280 FFPE invasive

brystkarsinomkasus [ca. 70 kasus fra hver HER2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] ble tilfeldig distribuert til to studiesteder (140 kasus til hvert studiested) for farging på et BenchMark XT- og et BenchMark ULTRA-instrument ved bruk av respektive anbefalte fargeprotokoller og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontroller omfattet PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides og et andre objektglass fra hvert kasus farget med negativt Ig-reagens. Fargede kasus fra studiested 1 og studiested 2 ble delt i fire objektglasssett og levert, ett sett om gangen, til tre forskjellige kvalifiserte lesere (patologer), én leser ved studiested 1, én ved studiested 2 og én ved studiested 3. Patologene, blindet til kasusstatus og fargingsplattform, evaluerte alle fire sett med objektglass og leverte en klinisk skår (dvs. 0, 1+, 2+, 3+) for hvert kasus. Resultatene ble analysert av Ventana. PPA-ratene (og nedre grense for de tosidige 95 % konfidensintervallene) for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet basert på positiv kontra negativ klinisk vurdering var 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) og 94.9 % (89.3) for henholdsvis leser A, B og C. NPA-ratene (og nedre grense for de tosidige 95 % konfidensintervallene) for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrumentet sammenlignet med BenchMark XT-instrumentet basert på positiv kontra negativ klinisk vurdering var 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) og 99.3 % (96.3) for henholdsvis leser A, B og C. OPA mellom PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoffet ved bruk av BenchMark ULTRA-instrument sammenlignet med BenchMark XT-instrument basert på 2 x 2-analyse av positiv kontra negativ klinisk vurdering var 91.8 %, 92.5 % og 97.4 % for henholdsvis leser A, B og C. 3 x 3-presentasjonen av samsvarsrater mellom plattformer for hver leser basert på klinisk skår (0/1+, 2+, 3+) er vist i Tabell 15, Tabell 16 og Tabell 17.

Tabell 15. 3 x 3-analyse for samsvarsrater mellom plattformer for BenchMark ULTRA- vs. BenchMark XT-instrumentet – leser A.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Leser 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
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			226/267 (84.6) (79.8-88.5)	

Tabell 16. 3 x 3-analyse for samsvarsrater mellom plattformer for BenchMark ULTRA- vs. BenchMark XT-instrumentet – leser B.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Leser 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
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			242/267 (90.6) (86.5-93.6)	

Tabell 17. 3 x 3-analyse for samsvarsrater mellom plattformer for BenchMark ULTRA- vs. BenchMark XT-instrumentet – leser C.

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Leser 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

BenchMark ULTRA-instrument	BenchMark XT-instrument			
Leser C	3+	2+	0, 1+	Totalt
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			257/267 (96.3) (93.2-98.0)	

Sammenligningsstudie mellom BenchMark ULTRA PLUS- og BenchMark ULTRA-instrumentet

Tre laboratorier, fra separate institusjoner i USA, deltok i en konkordansstudie mellom BenchMark ULTRA PLUS-instrumentet og BenchMark ULTRA-instrumentet. Avskårne objektglass med 122 FFPE-invasive brystkarsinomkasus fra hver HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+) ble farget av Ventana på et BenchMark ULTRA-instrument ved hjelp av den anbefalte fargeprotokollen og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollene inkluderte én PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide og ett positivt kasus med kontrollbrystkarsinomvæv per fargekjøring. Dessuten ble et andre objektglass for hvert testkasus farget med negativt Ig-reagens. Avskårne objektglass fra samme kasus ble randomisert og likt fordelt (40–41 kasus per studiested) mellom studiesteder for farging på et BenchMark ULTRA PLUS-instrument ved hjelp av den anbefalte fargeprotokollen og *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Kontrollene inkluderte én PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide og ett positivt kasus med kontrollbrystkarsinomvæv per fargekjøring. Dessuten ble et andre objektglass for hvert testkasus farget med negativt Ig-reagens. Patologer, blindet til kasusstatus farget på ett BenchMark IHC/ISH-instrument, evaluerte objektglassene og leverte en klinisk skår (dvs. 0, 1+, 2+, 3+). Etter en 2 ukers utvaskingsperiode evaluerte patologer objektglassene farget på det andre BenchMark IHC/ISH-instrumentet. Resultatene ble analysert av Ventana. En HER2-skår på IHC 0+ eller 1+ ble ansett som negativ, og en HER2-skår på IHC 2+ eller 3+ ble ansett som positiv. OPA-, PPA- og NPA-ratene var henholdsvis 91.0 % (333/366), 93.3 % (154/165) og 89.1 % (179/201). Tosidige 95 % CI-er ble beregnet ved hjelp av persentil bootstrap-metoden. Bakgrunns- og morfologiakseptabilitetsrater for alle kasus var 100 % for begge instrumenter. Tabell 18 viser disse resultatene.

Tabell 18. Gruppert samsvar for HER2-status for brystkarsinomkasus farget med anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA PLUS- vs. BenchMark ULTRA-instrumenter

BenchMark ULTRA PLUS HER2-status	BenchMark ULTRA HER2-status		Totalt
	Positiv	Negativ	
Positiv	154	22	176
Negativ	11	179	190
Totalt	165	201	366
	n/N	% (95 % CI)	
Positivt samsvar i prosent	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
Negativt samsvar i prosent	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
Totalt samsvar i prosent	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

Reproduserbarhet mellom patologer i prøver fra plattformssammenligningsstudie

Positive og negative samsvarsrater med 95 % konfidensintervaller med tosidig skår ble beregnet for de seks mulige parvise sammenligningene mellom lesere for hver plattform.

For BenchMark ULTRA-instrument var PPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B henholdsvis 94.7 % (126/133), 98.2 % (111/113), 98.2 % (111/113), 89.4 % (126/141), 78.7 % (111/141) og 83.5 % (111/133). NPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B var henholdsvis 88.8 % (119/134), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126) og 98.5 % (132/134). OPA-raten var høyest mellom leser A og leser B (91.8 %) og lavere mellom leser B og leser C (91.0 %) og leser A og leser C (88.8 %).

For BenchMark XT-instrument var PPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B henholdsvis 94.9 % (130/137), 98.3 % (116/118), 98.3 % (116/118), 90.9 % (130/143), 81.1 % (116/143) og 84.7 % (116/137). NPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B var henholdsvis 90.0 % (117/130), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124) og 98.5 % (128/130).

OPA-raten var høyest mellom leser A og leser B (92.5 %) og lavere mellom leser B og leser C (91.4 %) og leser A og leser C (89.1 %).

Sammenligningsstudie mellom *VIEW* DAB Detection Kit og *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Studiested 1-kohorten med 140 FFPE invasive brystkarsinomkasus [ca. 35 kasus fra hver HER-2-kategori (0, 1+, 2+, 3+)] ble brukt i en sammenligningsstudie mellom *VIEW* DAB Detection Kit og *ultraView* Universal DAB Detection Kit ved farging med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff på BenchMark ULTRA-instrument. Et enkelt fargelaboratorium og tre avlesningssteder i USA deltok i påvisningssammenligningsstudien. For PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrumentet var PPA-ratene mellom resultater oppnådd ved bruk av *VIEW* DAB Detection Kit- og *ultraView* Universal DAB Detection Kit-metoder basert på klinisk vurdering (positiv, negativ) 95.8 % (68/71), 96.9 % (63/65) og 96.5 % (55/57) for henholdsvis leser A, B og C, og NPA-ratene mellom påvisningsmetoder var 90.8 % (59/65), 91.5 % (65/71) og 97.5 % (77/79) for henholdsvis leser A, B og C. OPA-ratene mellom deteksjonskit var 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) og 97.1 % (132/136) for henholdsvis leser A, B og C. 3 x 3-presentasjonen av påvisningssamsvarsrater for hver leser basert på klinisk skår (0/1+, 2+, 3+) er vist i Tabell 19, Tabell 20 og Tabell 21.

Tabell 19. Leser A, 3 x 3-analyse av samsvarsrater for *VIEW* DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – PATHWAY HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW</i> DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leser 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
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			119/136 (87.5) (80.9-92.0)	

Tabell 20. Leser B, 3 x 3-analyse av samsvarsrater for *VIEW* DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW</i> DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leser 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
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			128/136 (94.1) (88.8-97.0)	

Tabell 21. Leser C, 3 x 3-analyse av samsvarsrater for *VIEW* DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging på BenchMark ULTRA-instrument.

<i>VIEW</i> DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leser C	3+	2+	0, 1+	Totalt
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Totalt	32	25	79	136
Totalt samsvar i prosent: n/N (%) (95 % CI)			132/136 (97.1) (92.7-98.9)	

Reproduserbarhet mellom patologer i prøver fra påvisningssammenligningsstudie

Positive og negative samsvarsrater med 95 % konfidensintervaller med tosidig skår ble beregnet for de seks mulige parvise sammenligningene mellom lesere for hver metode.

For MIEW DAB Detection Kit var PPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B henholdsvis 100.0 % (69/69), 98.2 % (56/57), 96.5 % (55/57), 93.2 % (69/74), 75.7 % (56/74) og 79.7 % (55/69). NPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B var henholdsvis 92.5 % (62/67), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) og 97.0 % (65/67). Den totale samsvarsraten var høyest mellom leser A og leser B (96.3 %) og lavere mellom leser A og leser C (86.0 %) og leser B og leser C (88.2 %).

For ultraView Universal DAB Detection Kit var PPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B henholdsvis 96.9 % (63/65), 98.2 % (56/57), 98.2 % (56/57), 88.7 % (63/71), 78.9 % (56/71) og 86.2 % (56/65). NPA-rater for leser A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A og C vs. B var henholdsvis 88.7 % (63/71), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65) og 98.6 % (70/71). De totale samsvarsratene var tilsvarende for hvert leserpar, 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) og 92.6 % (126/136) for henholdsvis leser A vs. B, leser A vs. C og leser B vs. C.

KLINISK YTTELSE

Sammenligningsstudier mellom PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody

En metodesammenligningsstudie ble gjennomført for å undersøke korrelasjonen av resultater mellom PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistoff og PathVysion HER2 FISH, begge tidligere FDA-godkjente diagnostiske tester. Seks utprøvere deltok i studien. To sett av tre forskjellige utprøvere evaluerte to uavhengige kohorter (kohort 1: n = 144, kohort 2: n = 178) ved hjelp av kjente brystkreftkasus farget med HER2 CB11 og HER2 4B5. FISH-data ble oppnådd fra pasienthistorikk. Et konsensusresultat fra de tre leserne for hvert antistoff ble opprettet for hvert kasus for å redusere variabilitet innenfor samme leser som er kjent for å forekomme med HER2-skåring.^{27,28,29} I alt 322 kasus ble evaluert. Objektglassene farget med PATHWAY anti-HER2 (CB11)-antistoff ble prosessert og farget i henhold til produsentens bruksanvisning angitt i metodearket for CB11-antistoff. Det var et gjennomsnitt på omtrent ett år mellom farging og avlesning av de CB11-fargede objektglassene. Siden skår fra én av de seks leserne var utenfor konfidensintervallet, presenteres data fra de to kohortene på følgende måte.

Reproduserbarhet av prøver mellom patologer i sammenligningsstudier

Tabell 22. Kohort 1 – IHC-konsensuskår fra tre patologer.

4B5-skår	CB11-skår			Totalt
	3+	2+	0, 1+	
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Totalt	31	37	75	143

Kohort 1: Ytelsesegenskaper for 3 x 3-presentasjon.
Totalt samsvar er (29+13+53)/143 = 66.4 % (95 % CI = 38.6 %, 59.7 %).

Kohort 1: Ytelsesegenskaper for 2 x 2-presentasjon (HER2-antistoffpositiv (2+ og 3+) og -negativ (0+ og 1+) skår kombineres).

- Positivt samsvar i prosent er (29+2+13)/(31+37) = 100 %
- (95 % CI = 97.5–100 %).
- Negativt samsvar i prosent er 53/75 = 70.7 % (95 % CI = 58.5–80.1 %).
- Totalt samsvar er (29+2+13+53)/143 = 84.7 % (95 % CI = 78.2–90.0 %).

Tabell 23. Kohort 2: IHC-konsensuskår fra tre patologer.

4B5-skår	CB11-skår			Totalt
	3+	2+	0, 1+	
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Totalt	73	20	85	178

Kohort 2: Ytelsesegenskaper for 3 x 3-presentasjon.
Totalt samsvar er (72+12+80)/178 = 92.1 % (95 % CI = 80.1 %, 93.1 %).

Kohort 2: Ytelsesegenskaper for 2 x 2-presentasjon (HER2-antistoffpositiv (2+ og 3+) og -negativ (0+ og 1+) skår kombineres).

- Positivt samsvar i prosent er (72+12+1+1)/(73+20) = 92.5 % (95 % CI = 85.2–96.9 %).
- Negativt samsvar i prosent er 80/85 = 94.1 % (95 % CI = 86.8–98.1 %).
- Totalt samsvar er (72+12+1+1+80)/178 = 93.3 % (95 % CI = 88.5–96.4 %).

Tabell 24. Kohort 1 – CB11 IHC-konsensuskår fra tre patologer sammenlignet med FISH.

CB11-skår	FISH-resultat		Totalt
	Positiv	Negativ	
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Totalt	86	58	144

Kohort 1: Ytelsesegenskaper for CB11 og FISH, 2 x 2-presentasjon (hvor skår på 2 og 3 anses positive).

- Positivt samsvar i prosent er (32+32)/86 = 74.4 % (95 % CI = 63.8–83.2 %).
- Negativt samsvar i prosent er 53/58 = 91.4 % (95 % CI = 80.9–97.1 %).
- Totalt samsvar er (32+32+53)/144 = 81.2 % (95 % CI = 73.9–87.2 %).

Tabell 25. Kohort 1 – 4B5 IHC-konsensuskår fra tre patologer sammenlignet med FISH.

4B5-skår	FISH-resultat		Totalt
	Positiv	Negativ	
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Totalt	86	58	144

Kohort 1: Ytelsesegenskaper for 4B5 og FISH, 2 x 2-presentasjon (hvor skår på 2 og 3 anses positive).

- Positivt samsvar i prosent er (55+25)/86 = 93.0 % (95 % CI = 87.9–96.3 %).
- Negativt samsvar i prosent er 47/58 = 81.0 % (95 % CI = 73.4–86.0 %).
- Totalt samsvar er (55+25+47)/144 = 88.2 % (95 % CI = 82.1–92.2 %).

Tabell 26. Kohort 2 – CB11 IHC-konsensuskår fra tre patologer sammenlignet med FISH.

CB11-skår	FISH-resultat		Totalt
	Positiv	Negativ	
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Totalt	93	85	178

Kohort 2: Ytelsesegenskaper for CB11 og FISH, 2 x 2-presentasjon (hvor skår på 2 og 3 anses positive).

- Positivt samsvar i prosent er $(72+13)/93 = 91.3\%$ (95 % CI = 85.0–96.7 %).
- Negativt samsvar i prosent er $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 83.9–96.3 %).
- Totalt samsvar er $(72+13+77)/178 = 91.0\%$ (95 % CI = 86.5–94.9 %).

Tabell 27. Kohort 2 – 4B5 IHC-konsensuskår fra tre patologer sammenlignet med FISH.

4B5-skår	FISH-resultat		Totalt
	Positiv	Negativ	
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Totalt	93	85	178

Kohort 2: Ytelsesegenskaper for 4B5 og FISH, 2 x 2-presentasjon (hvor skår på 2 og 3 anses positive).

- Positivt samsvar i prosent er $(72+11)/93 = 89.2\%$ (95 % CI = 82.5–95.1 %).
- Negativt samsvar i prosent er $77/85 = 90.6\%$ (95 % CI = 84.0–96.4 %).
- Totalt samsvar er $(72+11+77)/178 = 90.0\%$ (95 % CI = 85.4–93.6 %).

Reproduserbarhet av prøver mellom patologer i sammenligningsstudier

Siden det er velkjent at forskjellige patologer kan ha forskjellige tolkninger av IHC-objektglass, analyserte tre patologer hver av de to kohortene (til sammen 6 patologer) for å lese alle prøvene. En to-av-tre-regel ble brukt til å justere sluttresultatene. Nedenfor er et sammendrag over de variable resultatene oppnådd av de tre patologene i sammenligningsstudieprøvene for hver kohort (kohort 1: n = 178, kohort 2: n = 144).

Tabell 28. Kohort 1: 4B5-skåring for de tre patologene.

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

Merknad: I alt 3 prøver varierte med mer enn ett graderingsnivå (dvs. 0, 2+) når de ble evaluert av de tre patologene.

Prøve 1: Én patolog skåret 2+, to patologer skåret 0+.

Prøve 2: Én patolog skåret 0+, to patologer skåret 2+.

Prøve 3: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 1+, og den tredje skåret 2+.

Tabell 29. Kohort 1: CB11-skåring for de tre patologene.

HER2-skår	CB11-skår		
	Utprøver 1	Utprøver 2	Utprøver 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Totalt	174	178	178

Merknad: I alt 1 prøve varierte med mer enn ett graderingsnivå (dvs. 1–3+) når den ble evaluert av de tre patologene.

Prøve 1: Én patolog skåret 1+, den andre skåret 2+, og den tredje skåret 3+.

Tabell 30. Kohort 2: 4B5-skåring for de tre patologene.

HER2-skår	4B5-skår		
	Utprøver 4	Utprøver 5	Utprøver 6
3+	59	65	50
2+	30	28	39
0,1+	52	51	55
Totalt	141	144	144

Merknad: I alt 6 prøver varierte med mer enn ett graderingsnivå (f.eks. 0, 3+) når de ble evaluert av de tre patologene.

Prøve 1: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 0+, og den tredje skåret 2+.

Prøve 2: Én patolog skåret 1+, den andre skåret 1+, og den tredje skåret 3+.

Prøve 3: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 2+, og den tredje patologen skåret 2+.

Prøve 4 og 5: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 2+, og den tredje skåret 2+.

Prøve 6: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 3+, og den tredje skåret 3+.

Tabell 31. Kohort 2: CB11-skåring for de tre patologene.

HER2-skår	CB11-skår		
	Utprøver 4	Utprøver 5	Utprøver 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Totalt	144	144	144

Merknad: I alt 8 prøver varierte med mer enn ett graderingsnivå (dvs. 0–2+) når de ble evaluert av de tre patologene.

Prøve 1–6: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 1+ og den tredje skåret 2+.

Prøve 7 og 8: Én patolog skåret 0+, den andre skåret 2+, og den tredje skåret 2+.

Følgende tabell viser områdene med prosentvis samsvar på tvers av patologpar (tre par for hver kohort).

Tabell 32. 2X2-områder * samsvar for de tre patologene.

	Totalt samsvar i prosent	Positivt samsvar i prosent	Negativt samsvar i prosent
4B5 vs. CB11			
Kohort 1	82.6–86.9 %	97.3–100.0 %	68.0–75.4 %
Kohort 2	88.2–95.5 %	87.6–95.6 %	86.1–95.4 %
4B5 vs. 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 %
CB11 vs. 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+ og 3+ = Positiv

Klinisk utfallsstudie – KATHERINE

Ytelsen til PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (INFORM HER2 Dual ISH-analyse) ble undersøkt i KATHERINE (BO27938), en randomisert, åpen fase III-multisenterstudie, for å evaluere effekten og sikkerheten av trastuzumabemtansin (KADCYLA) sammenlignet med trastuzumab som adjuvant behandling for pasienter med HER2-positiv primær brystkreft med resttumor til stede patologisk i brystet eller aksillære lymfeknuter etter preoperativ behandling (NCT01772472).

Pasientprøver ble farget med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff og/eller INFORM HER2 Dual ISH-analyse og evaluert for fargeakseptabilitet og HER2-status. Samlet var de fleste prøvene forbehandlingsbiopsi (80.9 %), innsamlet primært som biopsi (75.3 %) eller via kirurgiske metoder (24.3 %). Flere prøver viste duktal neoplastisk undertype (95.4 %), og de fleste ble ikke oppnådd fra en metastatisk prøve (96.2 %).

Tabell 33 beskriver total akseptabilitetsrate for farging for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff i ITD-populasjonen (populasjon tiltenkt diagnose) på pasientnivå. Av i alt 1788 pasienter i PATHWAY ITD Population mislyktes 55 det initielle PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffargingsforsøket. Når farging ble gjentatt for disse pasientene, ble farging oppnådd for alle bortsett fra fire av dem. De initielle og endelige totale fargeakseptabilitetsratene for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistoff var henholdsvis 96.9 % og 99.8 %. Ratene for bakgrunnsfargeakseptabilitet og morfologiakseptabilitet for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffargede objektglass er også rapportert. Initieell og endelig bakgrunnsfargeakseptabilitetsrate for ITD Population var henholdsvis 99.6 % og 99.9 %. Initieell og endelige morfologiakseptabilitetsrater var henholdsvis 99.2 % og 99.9 %.

Tabell 33. Ytelsesegenskaper for PATHWAY anti-HER2 (4B5)-antistofffarging.

Attributt	Akseptabilitetsrate % (n/N) (95 % CI)	
	Initieell *	Endelig **
Total akseptabilitetsrate for farging	96.9 (1733/1788) (96.0, 97.6)	99.8 (1784/1788) (99.4, 99.9)
Bakgrunn	99.6 (1768/1775) (99.2, 99.8)	99.9 (1786/1787) (99.7, 100.0)
Morfologi	99.2 (1762/1776) (98.7, 99.5)	99.9 (1787/1788) (99.7, 100.0)

* Det initielle fargingsforsøket er det første fargingsforsøket for en pasient

** Det endelige fargingsforsøket er fargingsforsøket som ble brukt ved beslutning om inkludering i studien BO27938

KATHERINE omfattet 1486 pasienter med HER2-positiv, tidlig brystkreft med gjenværende invasiv tumor i brystet og/eller aksillære lymfeknuter etter taksan- og trastuzumab-basert behandling som en del av et neoadjuvant regime før inkludering i studien. Pasienter fikk radioterapi og/eller hormonbehandling samtidig med

studiebehandling i samsvar med lokale retningslinjer. Brysttumormprøver var påkrevd å vise overtrykk av HER2 definert som 3+ IHC- eller ISH-amplifiseringsforhold ≥ 2.0 bestemt ved et sentrallaboratorium. Pasienter ble randomisert (1:1) for å motta trastuzumab eller KADCYLA. Randomisering ble stratifisert etter klinisk fase ved presentasjon, hormonreseptorstatus, preoperativ HER2-rettet behandling (trastuzumab, trastuzumab pluss ytterligere HER2-rettede midler) og patologisk nodal status evaluert etter preoperativ behandling.

KADCYLA ble gitt intravenøst ved 3.6 mg/kg på dag 1 av en 21-dagers syklus. Trastuzumab ble gitt intravenøst ved 6 mg/kg på dag 1 av en 21-dagers syklus. Pasienter ble behandlet med KADCYLA eller trastuzumab i totalt 14 sykluser med mindre det var residiv sykdom, tilbakekalling av samtykke eller uakseptabel toksisitet, avhengig av hva som skjedde først. På tidspunktet for primæranalysen var medianbehandlingstid 10 måneder (område: 1–12) for KADCYLA, og medianbehandlingstid 10 måneder (område: 1–13) for trastuzumab. Pasienter som sluttet med KADCYLA, kunne fullføre hele den tiltenkte studiebehandlingen opptil 14 sykluser med HER2-rettet behandling med trastuzumab om nødvendig, basert på toksisitetshensyn og utprøvers skjønn.

Det primære effektendepunktet for KATHERINE-studien var invasiv sykdomsfri overlevelse (IDFS). IDFS ble definert som tiden fra datoen for randomisering til første forekomst av ipsilateral, invasiv brysttumoresidiv, ipsilateral lokal eller regional invasiv brystkreftresidiv, distant residiv, kontralateral invasiv brystkreft eller dødsfall av hvilken som helst årsak.

Pasientdemografi og baseline tumoregenskaper ble balansert mellom behandlingsarmer. Medianalderen var ca. 49 år (i gruppen 23–80 år), 72.8 % var hvite, 8.7 % var asiatiske, og 2.7 % var svarte eller afroamerikanske. Alle bortsett fra 5 pasienter var kvinner. 22.5 prosent av pasienter ble registrert i Nord-Amerika, 54.2 % i Europa og 23.3 % i resten av verden. Tumorprognostiske egenskaper, herunder hormonreseptorstatus (positiv: 72.3 %, negativ: 27.7 %), klinisk fase ved presentasjon (defekt: 25.3 %, opererbar: 74.8 %) og patologisk nodal status etter preoperativ behandling (nodepositiv: 46.4 %, nodenegativ ikke evaluert: 53.6 %) lignet hverandre i studiearmene.

De fleste pasientene (76.9 %) hadde fått en neoadjuvant kjemoterapibehandling med antracyklin. 19.5 % av pasienter fikk et annet HER2-rettet middel i tillegg til trastuzumab som en komponent i neoadjuvant behandling. Pertuzumab var den andre behandlingen hos 93.8 % av pasienter som fikk et annet neoadjuvant HER2-rettet middel.

En klinisk betydningsfull og statistisk signifikant forbedring i IDFS ble observert hos pasienter med brystkreftprøver som ble identifisert som HER2-positiv med PATHWAY anti-HER2 (4B5)-analyse, som fikk trastuzumabemtansin (KADCYLA) sammenlignet med trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, 95 % CI [0.32, 0.58]), tilsvarende 57 % lavere risiko for en IDFS-hendelse. Effektivitetsresultater for den IHC-positiv undergruppen er presentert i Tabell 34 og figur 2.

Dataanalyse viser også at med eller uten justeringen for differensialprøvetaking i studiepopulasjonen på grunn av lokal testforhåndsscreening er legemiddelets effektstimer tilsvarende.

Tabell 34. Effektivitetsresultater fra KATHERINE for den IHC-positiv undergruppen.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
<i>Primært endepunkt</i>	Invasiv sykdomsfri overlevelse (IDFS) ¹	
Antall (%) av pasientene med hendelse	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [95 % CI]	0.43 [0.32, 0.58]	
3-års hendelsesfri rate ² %	89.0	75.7

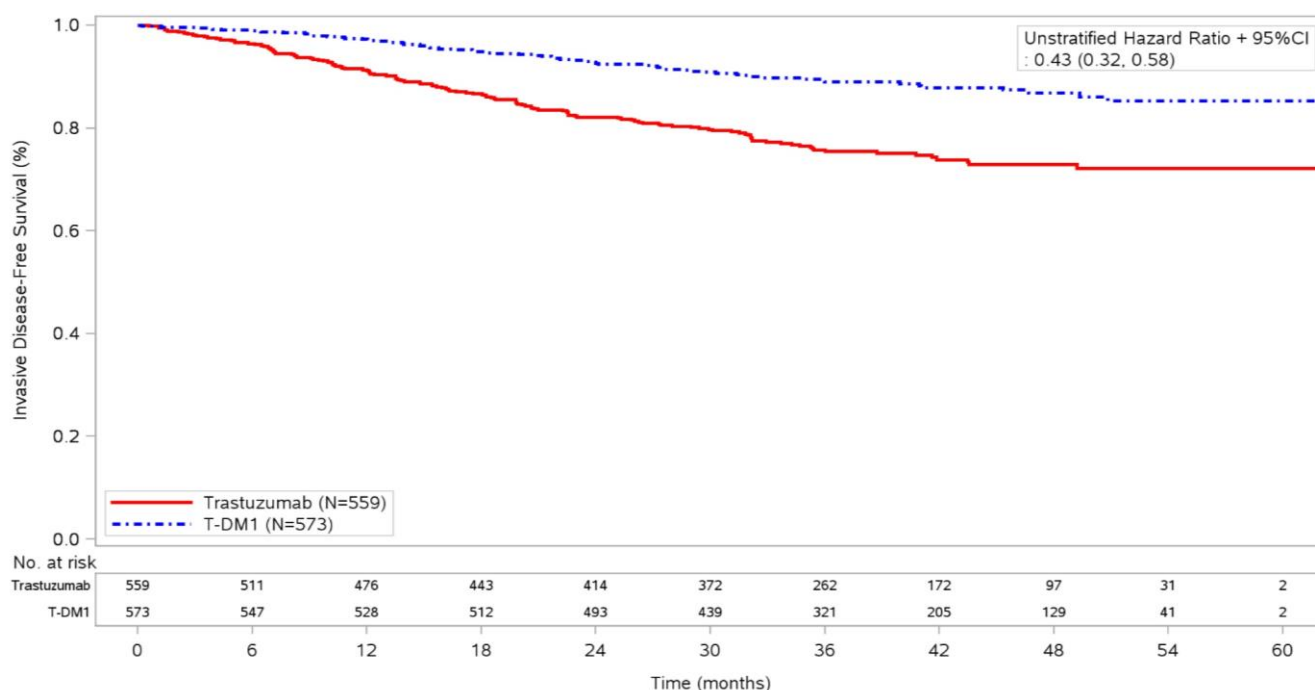
1. Data fra første foreløpige analyse

2. 3-års hendelsesfri rate avledet av Kaplan-Meier-estimer

Data fra KATHERINE-studien viser at adjuvant trastuzumabemtansin (KADCYLA) viste en klar behandlingsfordel sammenlignet med adjuvant trastuzumab (Herceptin) hos pasienter med HER2-positiv tidlig brystkreft med resterende sykdom etter fullført neoadjuvant behandling. PATHWAY anti-HER2 (4B5) og INFORM HER2 Dual ISH-analysene er nyttige for identifisering av de pasientene som sannsynligvis drar nytte av behandling med trastuzumabemtansin (KADCYLA).

FEILSØKING

1. Hvis den positive kontrollen viser svakere farging enn forventet, skal andre positive kontroller kjørt i den samme instrumentkjøringen sjekkes for å finne ut om det skyldes det primære antistoffet eller et av de felles sekundære reagensene.
2. Hvis den positive kontrollen er negativ, skal den sjekkes for å sikre at objektglasset har riktig strekkodeetikett. Hvis objektglasset er riktig merket, skal andre positive kontroller kjørt i den samme instrumentkjøringen sjekkes for å finne ut om det skyldes det primære antistoffet eller et av de felles sekundære reagensene. Vevsprøver kan være tatt, fiksert eller avparafinisert på feil måte. Riktig prosedyre må følges ved prøvetaking, oppbevaring og fiksering.
3. Hvis det er igjen parafin, vil det kanskje ikke skje noen farging. Avparafiniseringsprosedyren bør gjentas.
4. Hvis den spesifikke antistofffargingen er for intens, skal kjøringen gjentas med forkortelse av inkubasjonstiden med intervaller på 4 minutter, til ønsket fargingsintensitet oppnås.
5. Hvis vevsnittene vaskes av objektglasset, skal objektglassene sjekkes for å sikre at de er positivt ladet.
6. Du finner korigerende tiltak i avsnittet Trinnvis prosedyre i instrumentets brukermanual eller ved å kontakte lokal brukerstøtte.



Figur 2. Kaplan-Meier-kurve for invasiv sykdomsfri overlevelse i KATHERINE. (T-DM1: trastuzumabemtansin (KADCYLA))

t

REFERANSER

1. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232:1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumour cell lines by different molecular mechanisms. EMBO J. 1987;6:605-610.
3. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. Oncogene. 2007;26(45):6469-6487.
4. Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egfr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016;35(4):575-588.
5. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. Mol Biol Int. 2014;2014:852748.
6. Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
7. Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.
8. Keatings L, Sinclair J, Wright C, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17:234-247.
9. 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.
10. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. Mayo Clin Proc. 1994;69:57-58.
11. 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.
12. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(11):1364-1382.
13. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(8):1154-1161.
14. 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.
15. DePoter CR, Van Daele S, Van De Vijver MJ, 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.
16. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
17. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1980.
18. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
19. 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.
20. 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.
21. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
22. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
23. 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.
24. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66:194-199.
25. 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;73:626-32.
26. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
27. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, 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.
28. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
29. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

MERK: Et punktum brukes alltid i dette metodearket som desimalskilletegn for å skille mellom heltalls- og fraksjonsdelen av et desimaltall. Det brukes ikke skilletegn for tusener.

Sammendrag av sikkerhet og ytelse finner du her:

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

SYMBOLER

Ventana bruker følgende symboler og tegn i tillegg til de som er oppført i ISO 15223-1-standardens (for USA: se dialog.roche.com for definisjon av symboler som brukes):



Globalt artikkelnummer



Unik utstyrsidentifikator



Angir foretaket som importerer det medisinske utstyret til EU

OPPHAVSRETT

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* og VENTANA-logoen er varemerker for Roche. Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTINFORMASJON



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



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

