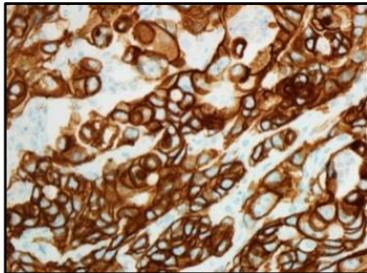


## VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

**REF** 790-4493

05999570001

**IVD**  50



**Figura 1. Tinción 3+ del carcinoma gástrico con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5).**

### USO PREVISTO

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección semicuantitativa del antígeno HER2 en secciones de tejido de mama normal o neoplásica y de tejido gástrico fijado con formol y embebido en parafina, teñidas en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

Este producto se ha indicado como ayuda en la evaluación de pacientes con cáncer de mama o gástrico para los que se está planteando un tratamiento con Herceptin®

(trastuzumab) o para las pacientes con cáncer de mama para las que se contempla la administración de un tratamiento con KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina) o PERJETA® (pertuzumab).

La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

Este anticuerpo está destinado para uso diagnóstico in vitro (IVD).

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5)) es un anticuerpo monoclonal de conejo (clon 4B5) generado contra el dominio interno del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). La clonación y la caracterización de HER2 corresponden a Akiyama et al en el año 1986.<sup>1</sup> El clon 4B5 ha demostrado su reacción a la proteína de 185 kD de los lisados celulares de SK-BR-3 mediante la técnica Western blotting. SK-BR-3 es una estirpe celular del carcinoma de mama con una sobreexpresión de 128 del mRNA de HER2.<sup>2</sup> El tamaño de la banda que se ha identificado se corresponde adecuadamente con el confirmado por Akiyama et al en el caso de la proteína HER2 (185 kD).<sup>1</sup> Los experimentos de inmunohistoquímica (IHC) con líneas celulares transfectadas (HEK293) han demostrado que el clon 4B5 tiñe las células transfectadas con HER2 y con HER4. No se ha observado la tinción de células transfectadas con HER1 ni con HER3. Los datos de la técnica Western blotting con una proteína recombinante HER4 también sugieren que el clon 4B5 detecta el epítipo HER4.

HER2 es un receptor transmembrana de tirosina quinasa de 185 kD con una estructura parecida a la del receptor del factor de crecimiento epidérmico.<sup>3,4</sup> La amplificación del gen y la correspondiente sobreexpresión de HER2 se ha observado en una variedad de tumores, como los carcinomas gástricos y de mama.<sup>3,4,5</sup> La sobreexpresión de proteína, inducida por la amplificación del gen *HER2*, es la causa principal de la carcinogénesis inducida por HER2.<sup>3</sup> El exceso de la expresión de la proteína HER2 en la membrana celular aumenta la señal de transducción, con la consecuente hiperactivación de la proliferación y la diferenciación que, en último término, provoca la formación de tumores.<sup>3,4,5</sup>

Entre el 15 y el 30 % de los cánceres ductales invasivos son positivos en la sobreexpresión de proteína HER2 y/o en la amplificación del gen.<sup>6,7</sup> Casi todos los casos de la enfermedad de Paget en mama y hasta el 90 % de los casos del carcinoma ductal in situ de tipo comedo son positivos.<sup>6,8</sup> La sobreexpresión de proteína HER2 y/o la amplificación del gen se dan en los adenocarcinomas gástricos y de la unión gastroesofágica.<sup>9,10,11</sup> En los estudios publicados se ha comunicado un amplio intervalo de la frecuencia de la sobreexpresión de HER2. No obstante, en uno de los conjuntos de

datos de cribado más numerosos, que contenía los datos de 3803 pacientes con adenocarcinoma gástrico y de unión gastroesofágica se comunicó que un 22 % de los pacientes contaban con resultados positivos en la sobreexpresión de proteína HER2 o la de amplificación del gen.<sup>12</sup>

### IMPORTANCIA CLÍNICA

El cáncer de mama es el carcinoma más habitual en mujeres y es la segunda causa de mortalidad por cáncer.<sup>4,6</sup> En Norteamérica, la probabilidad de una mujer de contraer cáncer de mama es de una entre ocho.<sup>4</sup> La detección temprana y los tratamientos adecuados tienen una importante repercusión en la supervivencia global.<sup>13,14</sup> Las muestras pequeñas de tejido se pueden utilizar fácilmente en los análisis mediante IHC rutinarios, lo que aporta a esta técnica, junto con los anticuerpos que detectan los antígenos, suma importancia en la interpretación del carcinoma y la convierte en una herramienta eficaz para el anatomopatólogo a la hora de llevar a cabo el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. Uno de los marcadores importantes del cáncer de mama en la actualidad es la oncoproteína HER2.<sup>15-18</sup> Los tratamientos con fármacos como Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) y KADCYLA (ado-trastuzumab emtansina/trastuzumab emtansina) han demostrado ser útiles en los pacientes con carcinoma de mama, dado que detienen y, en algunas ocasiones, invierten el crecimiento del cáncer.<sup>15-19</sup> Estos fármacos son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen a la proteína HER2 en las células cancerosas.<sup>7,15,18,19</sup> Los métodos de diagnóstico in vitro para la evaluación del estado de HER2 en pacientes con cáncer de mama son cruciales para ayudar al facultativo a determinar el tratamiento dirigido contra HER2.<sup>15-18</sup> La detección mediante IHC de la expresión de la proteína HER2 puede ser de utilidad en la evaluación de los pacientes con cáncer de mama para los que se está planteando la aplicación de un tratamiento dirigido contra HER2 con Herceptin (trastuzumab), PERJETA (pertuzumab) o KADCYLA (trastuzumab emtansina).

El cáncer gástrico es el quinto cáncer más habitual y es la principal causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial.<sup>10</sup> El tratamiento más habitual del cáncer gástrico es la cirugía.<sup>11,20</sup> Sin embargo, la mayor parte de los casos de cáncer gástrico se detectan en una estado avanzado de la enfermedad y a menudo es complicado llevar a cabo la cirugía.<sup>11,20</sup> LA quimioterapia se emplea para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado aunque el índice de supervivencia de los pacientes con cáncer es muy reducido.<sup>11,20</sup> El tratamiento dirigido a HER2 con trastuzumab es el puntal de la gestión del carcinoma de mama invasivo y tiene un gran valor terapéutico en la gestión del cáncer gástrico en pacientes con sobreexpresión del receptor.<sup>9,11</sup> La manifestación de la amplificación del gen *HER2* y/o de la sobreexpresión de proteína es fundamental para seleccionar a los pacientes a los que asignar el tratamiento con trastuzumab.<sup>9,11</sup> Los estudios clínicos han demostrado que los pacientes con cáncer de mama o gástrico con una elevada sobreexpresión de proteína HER2 y/o la amplificación del gen responden mejor al tratamiento con trastuzumab.<sup>9</sup> La detección mediante IHC de la expresión de la proteína HER2 sirve como ayuda en la evaluación de los pacientes con cáncer gástrico para los que se está planteando un tratamiento con Herceptin (trastuzumab).

En la interpretación de los resultados de cualquier sistema de detección de HER2 se debe tener en cuenta el hecho de que la expresión de HER2 se observa tanto en los tumores del cáncer de mama y gástrico como en el tejido sano, aunque con diferentes niveles y distintos patrones de expresión.<sup>10,21</sup> La preparación de los tejidos histológicos deja la morfología del tejido intacta, lo que supone una ventaja que contribuye a la interpretación de la positividad en HER2 de la muestra.

### PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) es un anticuerpo monoclonal de conejo que se une a HER2 en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecte inmunoglobulinas de conejo seguida de la incorporación de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (VIEW DAB Detection Kit) o mediante un conjugado de anticuerpo secundario y HRP (*UltraView* Universal DAB Detection Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática. En cada paso deben aplicarse con precisión tanto el tiempo como la temperatura de incubación. Cuando finaliza cada uno de los pasos de incubación, las secciones se enjuagan en el instrumento con el fin de detener la reacción y eliminar el material que no se ha ligado y que podría impedir la reacción que se quiere lograr en los pasos posteriores. Además, en el instrumento se aplica el Liquid Coverslip, que reduce al máximo la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos que contiene la muestra.

Los casos clínicos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Se recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o gástrico positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5), se debe teñir un segundo portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción de membrana en las células tumorales. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portaobjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama o gástrico negativo en HER2) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

### MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) contiene aproximadamente 30 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno HER2 humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón salino formado por 0.05 M Tris, 0.01 M EDTA y Brij-35 al 0.05 % con una proteína transportadora al 0.3 % y ácido sódico al 0.05 %, un conservante. Existen trazas de aproximadamente un 0.25 % de suero bovino fetal de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 6 µg/mL. El anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) es un IgG de conejo diluido de sobrenadantes de cultivo tisular.

Consulte en la hoja de datos correspondiente del kit de detección de VENTANA las descripciones detalladas de: Principio del procedimiento, Material y métodos, Recogida y preparación de muestras para análisis, Procedimientos de control de calidad, Resolución de problemas, Interpretación de los resultados y Limitaciones.

### MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No se suministran reactivos de tinción como los kits de detección de VENTANA ni componentes auxiliares, incluyendo portaobjetos de control de tejido negativos y positivos.

No todos los productos que aparecen en la hoja de datos están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local de asistencia técnica de Roche.

No se suministran los reactivos y materiales siguientes, pero pueden ser necesarios para la tinción:

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n.º cat. 790-4795 / 06683380001)
4. *ultraView* DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
5. *VIEW* DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001 [50 pruebas])
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Equipo de laboratorio de uso general
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH

### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Tras la recepción y cuando no se utilice, consérvese entre 2 y 8 °C. No lo congele.

Para garantizar una dispensación adecuada del reactivo y la estabilidad del anticuerpo, vuelva a poner el tapón del dispensador después de cada uso y almacene inmediatamente el dispensador en la nevera, en posición vertical.

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta.

No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %.<sup>22</sup> Los portaobjetos deberían teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

Se recomienda que los controles positivos y negativos se ejecuten simultáneamente con muestras desconocidas.

Es necesario cortar secciones de tejido de un grosor aproximado de 4 µm y recogerlas en el portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. Los estudios señalan que las secciones de tejido que se han dejado secar al aire y las secciones de estirpes celulares almacenadas a una temperatura de entre 2 y 8 °C se conservan estables durante seis meses. En cada laboratorio se deberá validar la estabilidad del corte del portaobjetos en función de sus propios procedimientos y de sus condiciones del entorno de conservación.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
6. Es posible que no esté disponible en todas las regiones el uso de este producto para la selección de pacientes que cumplen los requisitos de idoneidad para administrar un tratamiento con KADCYLA o PERJETA. Consulte a su representante local de servicio Roche para confirmar la disponibilidad en ubicaciones concretas.
7. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.<sup>23,24</sup>
8. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
9. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
10. Si se utiliza tal y como se indica en las instrucciones, este producto no se clasifica como una sustancia biopeligrosa. El conservante del reactivo es ácido sódico. Los indicios de sobreexposición a esta sustancia pueden ser, entre otros, irritación en la piel y los ojos e irritación en las membranas mucosas y las vías respiratorias altas. La concentración de ácido sódico que contiene este producto es 0.05 % y no cumple los criterios necesarios para clasificarla como sustancia peligrosa. La acumulación de NaN<sub>3</sub> puede reaccionar con los componentes de plomo y cobre de las tuberías y generar ácidos metálicos extremadamente explosivos. Cuando se vaya a eliminar, añada grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de ácidos en las tuberías.<sup>25</sup> Es posible que se presenten reacciones alérgicas sistémicas en personas con mayor sensibilidad.
11. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com).
12. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
13. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
14. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

## PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte las tablas que aparecen a continuación para ver los protocolos de tinción recomendados.

Este anticuerpo se ha optimizado para periodos de incubación específicos, pero el usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo.

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario de los instrumentos. Consulte la hoja de datos del kit de detección VENTANA correspondiente para obtener más detalles sobre los procedimientos de tinción de inmunohistoquímica.

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 790-4493.

**Tabla 1.** Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) con iVIEW DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Suave
Anticuerpo (Primario)	32 minutos, 37 °C	32 minutos, 37 °C	24 minutos, 36 °C
A/B Block (Biotin Blocking)	No seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

**Tabla 2.** Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) con ultraView Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Suave	CC1, Suave	ULTRA CC1, Suave
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
ultraWash	Seleccionado		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario o el acondicionamiento celular en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».<sup>26</sup>

En la Tabla 3 se indican los procedimientos de tinción recomendados para los carcinomas de mama y gástricos.

**Tabla 3.** Procedimientos de tinción en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Carcinoma de mama	Procedimiento de tinción iVIEW DAB o ultraView DAB*	Procedimiento de tinción iVIEW DAB o ultraView DAB*	Procedimiento de tinción iVIEW DAB o ultraView DAB*
Carcinoma gástrico	Gástrico GX uVDAB HER2 4B5 (Tabla 2)	Gástrico XT uVDAB HER2 4B5 (Tabla 2)	Gástrico ULTRA uVDAB HER2 4B5 (Tabla 2)

\* En las muestras de carcinoma de mama que se tiñen con los instrumentos BenchMark IHC/ISH se emplean los procedimientos de tinción con iVIEW DAB Detection Kit (Tabla 1) o ultraView Universal DAB Detection Kit (Tabla 2)

## PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

### Controles del sistema de líneas celulares

Ventana pone a su disposición, por separado, cuatro controles de líneas celulares fijados con formol y embebidos en parafina, cortados y colocados en un único portaobjetos cargado. PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (con n.º de referencia 781-2991) pueden resultar útiles a la hora de llevar a cabo la validación preliminar del método de procesamiento que se utiliza para la tinción de los tejidos con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Los cuatro controles de líneas celulares se caracterizan por la hibridación in situ para obtener el número de copias del gen, tal y como se muestra en la Tabla 4. Cuando se procesan y se tiñen adecuadamente, la tinción de las líneas celulares debería aparecer tal y como se describe en la hoja de datos de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide. Si la tinción indicada no es evidente en las secciones correspondientes, concretamente en los controles 1+ y 2+, debería repetirse la tinción de los tejidos.

**Tabla 4.** Características de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides.

Puntuación IHC de HER2	Estirpe celular	Proporción HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1.11
1+	T47D	1.12
2+	MDA-MB-453	2.66
3+	BT-474	5.53

\* La proporción HER2/Chr17 es el resultado de la media de tres lotes de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides obtenida mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH).

### CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe utilizar un tejido de control positivo que se haya fijado y procesado de la misma forma que las muestras del paciente con cada conjunto de condiciones de la prueba y en cada uno de los procedimientos de tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) que se lleven a cabo. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

Estos tejidos se utilizan para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actúa como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y preparación de tejidos. La opción más idónea es elegir un tejido que se caracterice por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC. Sin embargo, habitualmente los tejidos neoplásicos positivos en HER2 suelen dar como resultado una tinción positiva fuerte dada la naturaleza de la patología (sobreexpresión).

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos y los instrumentos, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras de prueba. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Como ejemplo de tejido de control positivo para el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) se encuentra el tejido de carcinoma de mama invasivo positivo o las muestras de carcinoma gástrico con positividad débil conocida en HER2. Los componentes de tinción positiva del tejido (tinción membranosa de células neoplásicas) sirven para comprobar que el anticuerpo se ha aplicado y el instrumento ha funcionado correctamente.

#### Control tisular negativo

El mismo portaobjetos que se utiliza como control de tejido positivo (carcinoma ductal o lobulillar invasivo de mama o carcinoma gástrico) puede servir como control tisular negativo. En los componentes sin tinción (como el estroma, las células linfáticas y los vasos sanguíneos circundantes) debería observarse una absoluta ausencia de tinción específica y deberían ofrecer una indicación sobre la tinción de fondo específica (falso positivo) con el anticuerpo primario. Utilice un tejido negativo conocido con una fijación, procesamiento e inclusión idénticos a los de la muestra del paciente.

#### Control de reactivo negativo

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. Para evaluar la tinción no específica se utiliza un control de reactivo negativo en lugar del anticuerpo primario. La tinción del portaobjetos debería realizarse con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del periodo de incubación del anticuerpo primario.

#### Discrepancias no explicadas

Las discrepancias no explicadas en los controles deberían comunicarse al representante local de asistencia técnica de Roche de forma inmediata. Si los resultados de los controles de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no serán válidos. Consulte la sección sobre Resolución de problemas. Identifique el problema y corrija; a continuación, repita las muestras del paciente.

#### Verificación del ensayo

Antes de comenzar a utilizar un anticuerpo o un sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, se debe comprobar la especificidad del anticuerpo mediante pruebas en una serie de tejidos que contengan características de rendimiento en inmunohistoquímica conocidas y que reflejen tejidos positivos y negativos conocidos (consulte la sección Procedimientos de control de calidad que se ha mencionado anteriormente y que se encuentra en la hoja de datos del producto y las recomendaciones sobre control de calidad de College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>27</sup>, CLSI Approved Guideline<sup>28</sup> o todos ellos). Estos procedimientos de control de calidad se deberían repetir con cada lote nuevo de anticuerpo o siempre que se cambien los parámetros del ensayo. Los tejidos de cáncer de mama y gástrico con un estado de HER2 conocido son adecuados para la verificación del ensayo.

#### INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de inmunotinción automatizada VENTANA provoca que un producto de reacción con color marrón (DAB) se precipite en los puntos del antígeno que localiza el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados.

#### Controles positivos

Debe examinarse el control de tejido positivo con tinción en primer lugar para comprobar que todos los reactivos han funcionado correctamente. La existencia de un producto de reacción con el color adecuado en las membranas de las células diana indica una reactividad positiva. En función de la duración de la incubación y de la potencia de la hematoxilina que se haya utilizado, la contratinción puede dar como resultado una coloración azul, más clara o más oscura, en los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados. Si el control de tejido positivo no muestra una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

#### Controles tisulares negativos

El control tisular negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de

reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se lleva a cabo una contratinción del tejido, es posible que se observe tinción alrededor de la parte exterior de la célula, como en los espacios intersticiales. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

#### Controles de reactivo negativo

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjuntivo en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que la tinción de las células necróticas o degeneradas suele ser no específica.

#### Tejido del paciente

Las muestras del paciente se deben examinar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como ocurre en todas las pruebas de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno en concreto, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo. Siempre que se vaya a interpretar un resultado de inmunohistoquímica, debería examinarse también la morfología de cada muestra de tejido mediante una sección de tejido con tinción de hematoxilina y eosina. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado.

Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados.

#### Convenciones de puntuación para la interpretación del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma de mama

Para que los carcinomas de mama se consideren positivos en la sobreexpresión de proteína HER2, deben cumplir los criterios límite en cuanto a la intensidad de la tinción (2+ o superior en una escala de 0 a 3+) y al porcentaje de células tumorales positivas (superior al 10 %). La tinción debe localizarse, además, en la membrana celular. Podría observarse una tinción citoplasmática, pero esta tinción no debe incluirse en los criterios de establecimiento de la positividad. Escanee la sección de tejido completa para garantizar la puntuación únicamente en las zonas bien conservadas y con tinción adecuada. A una tinción que rodea por completo la membrana citoplasmática debería asignarse una puntuación de intensidad de «2+» o de «3+». A la tinción parcial de la membrana se debería asignar la puntuación «1+». Es posible que sea necesario estudiar los casos límite con un aumento de 40x o superior para poder discernir entre las intensidades de «1+» y «2+». A diferencia de los casos con una puntuación de intensidad «3+», las puntuaciones de tinción «2+» contienen un anillo con una delineación muy clara y nítida, mientras que los casos con puntuaciones «3+» presentan un perfil mucho más grueso. A continuación se expone un gráfico de referencia rápida sobre los criterios de tinción. Consulte la *Guía de interpretación de la tinción del carcinoma de mama y del carcinoma gástrico con VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody* (n.º de ref. 1012716) para obtener una descripción más detallada con imágenes de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5).

**Tabla 5.** Criterios de intensidad y patrón de la tinción de membrana celular con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma de mama.

Patrón de tinción	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2
No se observa tinción de membrana	0	Negativa
Tinción difusa y parcial de la membrana en cualquier proporción de células cancerosas	1+	Negativa
Tinción de débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas > 10 %	2+	Equívoca*

Patrón de tinción	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2
Tinción intensa completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas > 10 %	3+	Positiva

\*Se recomienda reflejar en ISH

### Convenciones de puntuación para la interpretación del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma gástrico

Para que los carcinomas gástricos se consideren positivos en la sobreexpresión de proteína HER2, deben cumplir los criterios límite en cuanto a la intensidad y el patrón de la tinción de membrana (2+ o superior en una escala de 0 a 3+) y al porcentaje de células tumorales positivas. La tinción debe estar localizada en la membrana celular, pero no es necesario que sea una circunferencia completa, dado que se suele observar tinción basolateral y se debe tener en cuenta en la puntuación. Podría observarse una tinción del citoplasma y/o el núcleo, pero esta tinción no debe incluirse en los criterios de establecimiento de la positividad. En el carcinoma gástrico, el porcentaje de células tumorales positivas depende de si la muestra procede de una biopsia ( $\geq 5$  de células de cohesión) o de una extirpación quirúrgica de la muestra ( $\geq 10$  %).

A la hora de establecer las directrices para la puntuación de la inmunohistoquímica de HER2 en el cáncer gástrico, cabe destacar que, mientras que una tinción membranosa fuerte demuestra la sobreexpresión de proteína HER2 en las células neoplásicas, no tiene por qué ser una circunferencia completa.<sup>29</sup>

Se ha comunicado la presencia de tinción citoplasmática difusa, con o sin tinción nuclear, en el cáncer gástrico.<sup>30</sup> En el cáncer gástrico, únicamente la tinción membranosa se debe tener en cuenta en la determinación de la expresión de la proteína HER2.

La tinción inmunohistoquímica con el clon 4B5 puede dar lugar a tinción citoplasmática y nuclear de la mucosa gástrica normal y, en reducidas ocasiones, de las células neoplásicas del carcinoma gástrico y del carcinoma gástrico/esofágico. Se desconoce actualmente la naturaleza de esta tinción citoplasmática y nuclear. El patrón de tinción no debe confundirse con una tinción membranosa discontinua, dado que indica la positividad en HER2 en células neoplásicas.

Consulte la *Guía de interpretación de la tinción del carcinoma de mama y del carcinoma gástrico con VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody* para obtener una descripción más detallada con microimágenes de la tinción con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5).

**Tabla 6.** Criterios de intensidad y patrón de la tinción de membrana celular con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma gástrico.

Patrón de tinción: muestra de extirpación quirúrgica	Patrón de tinción: muestra de biopsia	Puntuación (para informar al facultativo que ha solicitado la prueba)	Evaluación de la tinción HER2
No se presenta reactividad o reactividad membranosa en < 10 % de las células tumorales	No hay reactividad ni reactividad membranosa en ninguna célula tumoral	0	Negativa
Reactividad membranosa difusa o apenas perceptible en $\geq 10$ % de las células tumorales; las células son reactivas únicamente en parte de la membrana	Grupo de células tumorales* con reactividad membranosa difusa o apenas perceptible independientemente del porcentaje de clústers tumorales con tinción	1+	Negativa

Patrón de tinción: muestra de extirpación quirúrgica	Patrón de tinción: muestra de biopsia	Puntuación (para informar al facultativo que ha solicitado la prueba)	Evaluación de la tinción HER2
Reactividad membranosa de débil a moderada, completa, basolateral o lateral en $\geq 10$ % de las células tumorales	Grupo de clústers tumorales* con reactividad membranosa de débil a moderada, completa, basolateral o lateral independientemente del porcentaje de células tumorales con tinción	2+	Equivoca**
Reactividad membranosa fuerte, completa, basolateral o lateral en $\geq 10$ % de las células tumorales	Grupo de clústers tumorales* con reactividad membranosa fuerte, completa, basolateral o lateral independientemente del porcentaje de células tumorales con tinción	3+	Positiva

\*  $\geq 5$  células de cohesión

\*\* Se recomienda reflejar en ISH

### LIMITACIONES

#### Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser el resultado de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para interpretar la preparación de la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
5. VENTANA proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.

7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.<sup>31</sup> Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.<sup>32</sup>
9. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.<sup>33</sup>
10. Como ocurre en todas las pruebas de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

### LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Este anticuerpo se ha optimizado, tal y como se indica en la tabla Tabla 1 y la Tabla 2, para los instrumentos BenchMark IHC/ISH y las sustancias químicas de detección. Es posible que sea necesario incrementar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales por las variaciones que se dan en la fijación y el procesamiento de los tejidos. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».<sup>26</sup>

El anticuerpo, cuando se utiliza junto con los kit de detección y los accesorios VENTANA, detecta el antígeno que permanece una vez se han llevado a cabo la fijación en formol, el procesamiento del tejido y el corte. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

No se ha sometido a pruebas la especificidad de la médula ósea. El usuario debe establecer la tinción que considera adecuada en los tejidos mencionados anteriormente antes de la interpretación de la información sobre la tinción.

La tinción inmunohistoquímica con el clon 4B5 puede dar lugar a tinción citoplasmática y nuclear de la mucosa gástrica normal y, en reducidas ocasiones, de las células neoplásicas del carcinoma gástrico y del carcinoma gástrico/esofágico. Se desconoce actualmente la naturaleza de esta tinción citoplasmática y nuclear. El patrón de tinción no debe confundirse con una tinción membranosa discontinua que indica la positividad en HER2 en células neoplásicas.

Es posible que no estén todos los ensayos registrados en cada instrumento. Póngase en contacto con el representante local de servicio Roche para obtener más información.

### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se realizaron pruebas de tinción para evaluar la sensibilidad, especificidad y precisión y los resultados se indican a continuación.

#### RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

##### Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y especificidad del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos normales. Los resultados de la tinción se muestran en la Tabla 7. La sensibilidad y especificidad del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) también se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos neoplásicos. Los resultados de la tinción se muestran en la Tabla 8. La tinción para comprobar la especificidad y la sensibilidad se llevó a cabo con el protocolo VIEW DAB Detection Kit en un instrumento BenchMark XT o con el protocolo ultraView Universal DAB Detection Kit en el caso del instrumento BenchMark ULTRA que se han mencionado anteriormente.

La tinción positiva en el epitelio amigdalino, el epitelio esofágico, la próstata, el nervio periférico, la paratiroidea, el cáncer de mama, de colon y ovárico es coherente con la documentación publicada al respecto sobre la expresión de HER2.

**Tabla 7.** La sensibilidad/especificidad del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/6	Intestino delgado	0/6
Cerebelo	0/6	Colon	0/46
Glándula suprarrenal	0/6	Hígado	0/6
Ovario	0/6	Glándula salival	0/3
Páncreas	0/6	Lengua	0/3
Ganglio linfático	0/12	Riñón	0/6
Glándula pituitaria	0/5	Próstata	1/6
Testículos	0/6	Vejiga <sup>b</sup>	3/3
Tiroides	0/6	Recto	0/6
Mama	0/14	Glándula paratiroidea <sup>c</sup>	4/6
Bazo	0/6	Endometrio	0/3
Amígdala <sup>a</sup>	3/6	Útero	0/3
Timo	0/5	Cuello del útero	0/5
Médula ósea	0/3	Endocervix	0/1
Pulmón	0/6	Músculo esquelético	0/6
Corazón	0/5	Piel	0/6
Pericardio	0/3	Nervio	2/6
Esófago	1/6	Mesotelio	0/3
Estómago	0/11	N/A	N/A

<sup>a</sup> Tinción focal de la superficie de las células epiteliales

<sup>b</sup> Tinción membranosa de las células superficiales en paraguas

<sup>c</sup> Tinción focal de membrana

**Tabla 8.** La sensibilidad/especificidad del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/2
Meningioma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebro)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/2
Carcinoma, sin especificar (ovario)	1/2
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	0/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Carcinoma, sin especificar (páncreas)	0/3
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	0/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma, sin especificar (tiroides)	0/3
Carcinoma ductal microinvasivo (mama)	2/2
Carcinoma ductal invasivo (mama)	44/99
Carcinoma, sin especificar (mama)	1/4
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Carcinoma, sin especificar (pulmón)	0/2
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/4
Adenocarcinoma (estómago)	8/88
Carcinoma de células en anillo de sello (Estómago)	0/4
Carcinoma, sin especificar (estómago)	0/3
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
Tumor estromal gastrointestinal (intestino delgado)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/32
Tumor estromal gastrointestinal (colon)	0/1
Carcinoma, sin especificar (colon)	1/3
Adenocarcinoma (recto)	1/5
Tumor estromal gastrointestinal (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/3
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma, sin especificar (hígado)	0/3
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Carcinoma, sin especificar (riñón)	0/5
Adenocarcinoma (próstata)	0/2
Carcinoma, sin especificar (próstata)	0/3
Leiomioma	0/3
Adenocarcinoma (útero)	0/1
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Neurofibroma (lumbar)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma polimorfo (peritoneo)	0/1
Linfoma, sin especificar	0/3
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (bazo)	0/1
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	1/1
Leiomiocarcinoma (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomiocarcinoma (músculo liso)	0/1
Adenocarcinoma rectal (metastásico)	0/1
Adenocarcinoma de colon (metastásico)	0/7
Adenocarcinoma mucinoso de colon (metastásico)	0/1
Melanoma	0/2
Neoplasia neuroendocrina, sin especificar	0/2
Sarcoma, sin especificar	0/2
Carcinoma no diferenciado, sin especificar	0/1

### Rendimiento de análisis en los casos de mama

#### Características de rendimiento en el instrumento BenchMark ULTRA con *VIEW* DAB Detection Kit o *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Reproducibilidad entre laboratorios y entre días de la tinción con el instrumento BenchMark ULTRA: Tres laboratorios, pertenecientes a instituciones diferentes de EE. UU., participaron en el estudio de reproducibilidad entre laboratorios. Se distribuyeron a los sitios del estudio portaobjetos con secciones de 48 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [12 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] y un par de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides en cada una de las 12 sesiones de tinción para su tinción con un instrumento BenchMark ULTRA y el protocolo de tinción recomendado, junto con *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada caso teñido con el reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Los resultados se analizaron en Ventana. Con la nomenclatura estándar para las tablas de 2x2, el promedio de concordancia positiva (APA) en todos los sitios se calculó a través de la fórmula  $[2a/(2a+b+c)]$  y el promedio de concordancia negativa (ANA) se calculó a través de la fórmula  $[2d/(2d+b+c)]$ . En todos los sitios, el APA entre sitios, con base en la evaluación clínica (positivo/negativo), fue del 90.0 % (108/120) y el ANA fue del 92.9 % (156/168). En las comparaciones entre pares de los sitios, se calculó el APA mediante  $a/(a+c)$  y el ANA mediante  $d/(b+d)$ . Los porcentajes de APA entre sitios fueron del 93.0 % (40/43), del 87.2 % (34/39) y del 89.5 % (34/38) entre el sitio A y el sitio B, entre el sitio A y el sitio C y entre el sitio B y el sitio C, respectivamente. Los porcentajes de ANA entre sitios fueron del 94.3 % (50/53), del 91.2 % (52/57) y del 93.1 % (54/58) entre el sitio A y el sitio B, entre el sitio A y el sitio C y entre el sitio B y el sitio C, respectivamente.

Las tablas que aparecen a continuación son presentaciones de 3x3 de los resultados de cada lector con base en la puntuación clínica, en la que se separaron 2+ y 3+.

**Tabla 9.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el sitio A y el sitio B: clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Sitio A	Sitio B			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Total	12	9	27	48
<b>Porcentaje de concordancia global (OPA): n/N (%)</b>				43/48 (89.6)

**Tabla 10.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el sitio A y el sitio C: clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Sitio A	Sitio C			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Total	12	5	31	48
<b>Porcentaje de concordancia global (OPA): n/N (%)</b>				42/48 (87.5)

**Tabla 11.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el sitio B y el sitio C: clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Sitio B	Sitio C			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Total	12	5	31	48
<b>Porcentaje de concordancia global (OPA): n/N (%)</b>				44/48 (91.7)

#### Reproducibilidad entre días de la tinción con el instrumento BenchMark ULTRA

En la parte del estudio correspondiente a la reproducibilidad entre días (IDR) se incluyeron 12 casos con una distribución prevista de aproximadamente tres (3) casos de cada puntuación clínica (0, 1+, 2+ y 3+). En total se llevó a cabo la parte del estudio correspondiente a la IDR mediante cinco sesiones en un instrumento BenchMark ULTRA en un solo centro (Sitio C) y en un periodo mínimo de 20 días, de forma que las tinciones no se realizaran en dos días consecutivos. Los porcentajes de APA y ANA de la IDR, con base en la evaluación clínica de la tinción con el clon 4B5 en el sitio C en todos los días, fue en ambos casos del 100 %. Los índices de los índices de concordancia global (OPA) de las comparaciones entre días, con base en las puntuaciones clínicas, fueron del 100 % en cada una de las comparaciones entre días y en la combinación de todos los días.

#### Estudio de comparación entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark XT

Dos laboratorios de tinción únicos y tres sitios de lectura de EE. UU. participaron en el estudio de comparación de plataformas. Se distribuyeron aleatoriamente portaobjetos con secciones de 280 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [aproximadamente 70 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] a dos

sitios de tinción (140 casos a cada uno) para que se llevara a cabo la tinción con el instrumento BenchMark XT y el instrumento BenchMark ULTRA con el protocolo de tinción recomendado y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada caso teñido con el reactivo Ig negativo. Los casos con tinción del Sitio 1 y el Sitio 2 se dividieron en cuatro conjuntos de portaobjetos que se facilitaron, de uno en uno, a los tres lectores cualificados (anatomopatólogos), un lector en el sitio 1, otro en el Sitio 2 y, el último, en el Sitio 3. Tanto los estados de los casos como la plataforma de tinción estaban enmascarados y los anatomopatólogos evaluaron en estas condiciones los cuatro conjuntos de portaobjetos y proporcionaron una puntuación clínica en cada caso (0, 1+, 2+, 3+). Los resultados se analizaron en Ventana. Los porcentajes de PPA (y el límite inferior de los intervalos de confianza del 95 % bilateral) de la tinción con el anticuerpo del clon 4B5 en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basados en la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron del 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) y del 94.9 % (89.3) en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. Los porcentajes de NPA (y el límite inferior de los intervalos de confianza del 95 % bilateral) de la tinción con el anticuerpo del clon 4B5 en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basados en la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron del 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) y del 99.3 % (96.3) en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. El OPA de la tinción con el clon 4B5 del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basado en un análisis 2x2 de la evaluación clínica (positiva, negativa), fue de 91.8 %, 92.5 % y de 97.4 % en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. En las tablas que aparecen a continuación se muestra la presentación 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas de cada lector, con base en las puntuaciones clínicas (0/1+, 2+, 3+):

**Tabla 12.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector A.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT				
	Lector A	3+	2+	0, 1+	Total
3+		84	11	1	96
2+		8	28	9	45
0, 1+		4	8	114	126
Total		96	47	124	267
<b>Porcentaje de concordancia global: n/N (%) (CI del 95 %)</b>				226/267 (84.6) (79.8-88.5)	

**Tabla 13.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector B.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT				
	Lector B	3+	2+	0, 1+	Total
3+		64	2	1	67
2+		3	56	7	66
0, 1+		2	10	122	134
Total		69	68	130	267
<b>Porcentaje de concordancia global: n/N (%) (CI del 95 %)</b>				242/267 (90.6) (86.5-93.6)	

**Tabla 14.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector C.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT			
Lector C	3+	2+	0, 1+	Total
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Total	66	52	149	267
<b>Porcentaje de concordancia global:</b> n/N (%) (CI del 95 %)				
257/267 (96.3) (93.2-98.0)				

**Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras del estudio de comparación de instrumentos**

Los índices de concordancia positiva y negativa con intervalos de confianza del 95 % bilateral se calcularon con base en las seis posibles comparaciones entre pares de todos los lectores en cada plataforma.

En el instrumento BenchMark ULTRA, los porcentajes de PPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 94.7 % (126/133), del 98.2 % (111/113), del 98.2 % (111/113), del 89.4 % (126/141), del 78.7 % (111/141) y del 83.5 % (111/133) respectivamente. Los porcentajes de NPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 88.8 % (119/134), del 80.5 % (124/154), del 85.7 % (132/154), del 94.4 % (119/126), del 98.4 % (124/126) y del 98.5 % (132/134) respectivamente. El porcentaje de OPA más elevado se dio entre el lector A y el lector B (91.8 %) y algo más bajo entre el lector B y el lector C (91.0 %) y el lector A y el lector C (88.8 %).

En el instrumento BenchMark XT, los porcentajes de PPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 94.9 % (130/137), del 98.3 % (116/118), del 98.3 % (116/118), del 90.9 % (130/143), del 81.1 % (116/143) y del 84.7 % (116/137) respectivamente. Los porcentajes de NPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 90.0 % (117/130), del 81.9 % (122/149), del 85.9 % (128/149), del 94.4 % (117/124), del 98.4 % (122/124) y del 98.5 % (128/130) respectivamente. El porcentaje de OPA más elevado se dio entre el lector A y el lector B (92.5 %) y algo más bajo entre el lector B y el lector C (91.4 %) y el lector A y el lector C (89.1%).

**Estudio de comparación entre *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit***

Para llevar a cabo el estudio comparativo entre el kit *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit* de las tinciones con el clon 4B5 con un instrumento BenchMark ULTRA, se utilizó en el Sitio 1 una cohorte de 140 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [aproximadamente 35 casos de cada categoría de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)]. Un laboratorio de tinción único y tres centros de lectura de EE. UU. participaron en el estudio de comparación de la detección. En el caso de la tinción con el anticuerpo del clon 4B5 en el instrumento BenchMark ULTRA, los porcentajes de PPA entre los resultados obtenidos mediante los métodos *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit*, con base en la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron del 95.8 % (68/71), del 96.9 % (63/65) y del 96.5 % (55/57) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente, y los porcentajes de NPA entre los métodos de detección fueron del 90.8 % (59/65), del 91.5 % (65/71) y del 97.5 % (77/79) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente. Los porcentajes de OPA entre los kits de detección fueron del 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) y del 97.1 % (132/136) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente. En las tablas que aparecen a continuación se muestra la presentación 3x3 de los índices de concordancia de la comparación de la detección de cada lector, con base en las puntuaciones clínicas (0/1+, 2+, 3+)

**Tabla 15.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit* del Lector A: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Lector A	3+	2+	0, 1+	Total
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Total	46	25	65	136
<b>Porcentaje de concordancia global:</b> n/N (%) (CI del 95 %)				
119/136 (87.5) (80.9-92.0)				

**Tabla 16.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit* del Lector B: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Lector B	3+	2+	0, 1+	Total
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Total	33	32	71	136
<b>Porcentaje de concordancia global:</b> n/N (%) (CI del 95 %)				
128/136 (94.1) (88.8-97.0)				

**Tabla 17.** Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre *VIEW DAB Detection Kit* y *ultraView Universal DAB Detection Kit* del Lector C: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

<i>VIEW DAB Detection Kit</i>	<i>ultraView Universal DAB Detection Kit</i>			
Lector C	3+	2+	0, 1+	Total
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Total	32	25	79	136
<b>Porcentaje de concordancia global:</b> n/N (%) (CI del 95 %)				
132/136 (97.1) (92.7-98.9)				

**Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras del estudio de comparación de detección:**

Los índices de concordancia positiva y negativa con intervalos de confianza del 95 % bilateral se calcularon con base en las seis posibles comparaciones entre pares de todos los lectores con cada método.

En el caso de *VIEW DAB Detection Kit*, los porcentajes de PPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 100.0 % (69/69), del 98.2 % (56/57), del 96.5 % (55/57), del 93.2 % (69/74), del 75.7 % (56/74) y del 79.7 % (55/69) respectivamente. Los porcentajes de NPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 92.5 % (62/67), del 77.2 % (61/79), del 82.3 % (65/79), del 100.0 % (62/62), del 98.4 % (61/62) y del 97.0 % (65/67) respectivamente. El índice de concordancia global más elevado se dio entre el lector A y el lector B (96.3 %) y algo más bajo entre el lector A y el lector C (86.0 %) y el lector B y el lector C (88.2 %).

En el caso de *ultraView* Universal DAB Detection Kit, los porcentajes de PPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 96.9 % (63/65), del 98.2 % (56/57), del 98.2 % (56/57), del 88.7 % (63/71), del 78.9 % (56/71) y del 86.2 % (56/65) respectivamente. Los porcentajes de NPA de los lectores A frente a B, A frente a C, B frente a C, B frente a A, C frente a A y C frente a B fueron del 88.7 % (63/71), del 81.0 % (64/79), del 88.6 % (70/79), del 96.9 % (63/65), del 98.5 % (64/65) y del 98.6 % (70/71) respectivamente. Los índices de concordancia global fueron parecidos entre cada par de lectores, con resultados de 92.6 % (126/136), 88.2 % (120/136) y de 92.6 % (126/136) en el caso de los lectores A y B, los lectores A y C y los lectores B y C, respectivamente.

#### Estudios de reproducibilidad entre laboratorios y entre lectores en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con *ultraView* Universal DAB Detection Kit

Tres laboratorios, pertenecientes a instituciones diferentes de EE. UU., participaron en el estudio de reproducibilidad entre laboratorios. Se distribuyeron a cada sitio de estudio portaobjetos con secciones de 28 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [7 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] y un par de portaobjetos de control (un PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide y un caso de tejido de carcinoma de mama de control) en cada una de las 10 sesiones de tinción para su tinción con un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y el protocolo de tinción recomendado, junto con *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, un caso de tejido de carcinoma de mama de control y un segundo portaobjetos de cada prueba de caso teñido con el reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Los resultados se analizaron en Ventana.

Se evaluó la reproducibilidad del estado de HER2 (positivo o negativo) de todos los portaobjetos de casos que se podían evaluar con el estado HER2 modal a nivel de caso como referencia para cada uno de ellos. A efectos del cálculo de los índices de concordancia, una puntuación HER2 de 0 o de 1+ se consideraba negativa y una puntuación HER2 de 2+ o 3+ se consideraba positiva. El estado HER2 modal de cada caso se determinó como el resultado del lector que se observaba con mayor frecuencia (positivo o negativo) en el caso en cuestión. Todas las observaciones que se obtuvieron mediante la combinación de todos los sitios, los lectores, los días y los casos de la población de portaobjetos de casos que se podían evaluar se compararon con los resultados del estado HER2 modal. Los PPA, NPA y OPA de la combinación de análisis fueron del 97.9 % (411/420), del 97.6 % (410/420) y del 97.7 % (821/840) respectivamente. También se evaluó la reproducibilidad del estado HER2 como los porcentajes de APA, ANA y OPA de todas las posibles comparaciones entre pares entre los sitios y de todas las comparaciones entre sitios combinadas. En el caso de la reproducibilidad entre sitios, los resultados de APA, ANA y OPA fueron del 95.9 %, del 95.9 % y del 95.9 % respectivamente. En el caso de la reproducibilidad entre lectores, los resultados de APA, ANA y OPA fueron del 95.5 %, del 95.5 % y del 95.5 %. En el caso de la reproducibilidad entre días, los resultados de APA, ANA y OPA fueron del 97.0 %, del 97.0 % y del 97.0 %. Los intervalos de confianza (CI) bilaterales del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil.

En las tablas 18-21 se encuentran las presentaciones de estos resultados.

**Tabla 18.** Concordancia combinada del estado HER2 con el estado modal a nivel de caso de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en BenchMark ULTRA PLUS.

Estado HER2	Estado modal BenchMark ULTRA PLUS		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	411	10	421
Negativa	9	410	419
Total	420	420	840
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	411/420	97.9 (95.7, 99.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	410/420	97.6 (94.3, 100.0)	
Porcentaje de concordancia global	821/840	97.7 (96.0, 99.3)	

**Tabla 19.** Índice de concordancia combinada del sitio de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en BenchMark ULTRA PLUS.

Estado HER2 del Sitio i	Estado HER2 del Sitio j		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	4037	163	4200
Negativa	183	4017	4200
Total	4220	4180	8400
	n/N	% (CI del 95 %)	
Promedio de concordancia positiva	8074/8420	95.9 (92.8, 98.6)	
Promedio de concordancia negativa	8034/8380	95.9 (92.5, 98.7)	
Porcentaje de concordancia global	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

Nota: Los Sitios i y j son los sitios (Sitio A, Sitio B y Sitio C) que se emplearon en el estudio. El índice de concordancia combinado se calcula combinando todas las posibles comparaciones entre todos los sitios (Sitio A frente a B, A frente a C y B frente a C).

**Tabla 20.** Índices de concordancia combinada entre lectores de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en BenchMark ULTRA PLUS.

Estado HER2 del Lector 1	Estado HER2 del Lector 2		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	201	9	210
Negativa	10	200	210
Total	211	209	420
	n/N	% (CI del 95 %)	
Promedio de concordancia positiva	402/421	95.5 (92.0, 98.6)	
Promedio de concordancia negativa	400/419	95.5 (91.6, 98.6)	
Porcentaje de concordancia global	401/420	95.5 (91.9, 98.6)	

Nota: Los Lectores 1 y 2 son los lectores del mismo sitio del estudio (Sitio A, Sitio B o Sitio C) que se emplearon en el estudio. El índice de concordancia combinado se calcula mediante la combinación de las concordancias entre lectores de un sitio en todos los sitios del estudio.

**Tabla 21.** Índices de concordancia combinada entre días de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en BenchMark ULTRA PLUS.

Estado HER2 del Día i	Estado HER2 del Día j		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	817	15	832
Negativa	35	813	848
Total	852	828	1680
	n/N	% (CI del 95 %)	
Promedio de concordancia positiva	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Promedio de concordancia negativa	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	

Estado HER2 del Día i	Estado HER2 del Día j		Total
	Positiva	Negativa	
<b>Porcentaje de concordancia global</b>	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

Nota: Los Días i y j son los días (del Día 1 al Día 5) de los días de tinción del estudio. El índice de concordancia combinado se calcula mediante la combinación de todas las posibles comparaciones entre dos días cualquiera de cada lector en cada sitio.

#### Estudio de comparación entre el instrumento BenchMark ULTRA PLUS y el instrumento BenchMark ULTRA

Tres laboratorios de diferentes instituciones de Estado Unidos participaron en un estudio de concordancia entre el instrumento BenchMark ULTRA PLUS y el instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron en Ventana portaobjetos con secciones de 122 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE de cada una de las categorías de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+) con el instrumento BenchMark ULTRA y el protocolo de tinción recomendado, junto a *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles se encontraban un portaobjetos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide y un tejido de control positivo de carcinoma de mama por sesión de tinción. Además, se tiñó un segundo portaobjetos de cada caso de prueba con un reactivo Ig negativo. Los portaobjetos con secciones de los mismos casos se aleatorizaron y se distribuyeron de forma equitativa (40-41 casos por sitio) en los sitios del estudio para su tinción en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con el protocolo de tinción recomendado y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles se encontraban un portaobjetos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide y un tejido de control positivo de carcinoma de mama por sesión de tinción. Además, se tiñó un segundo portaobjetos de cada caso de prueba con un reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos teñidos en un instrumento BenchMark IHC/ISH y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Tras un periodo de reposo de dos semanas, los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos teñidos en el segundo instrumento BenchMark IHC/ISH. Los resultados se analizaron en Ventana. Una puntuación HER2 de IHC de 0+ o de 1+ se consideraba negativa y una puntuación HER2 de IHC de 2+ o de 3+ se consideraba positiva. Los porcentajes de OPA, PPA y NPA fueron del 91.0 % (333/366), del 93.3 % (154/165) y del 89.1 % (179/201) respectivamente. Los intervalos de confianza (CI) bilaterales del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil. Los índices de aceptabilidad de fondo y morfología de todos los casos fueron del 100 % en ambos instrumentos. En la tabla 22 se encuentran las presentaciones de estos resultados.

**Tabla 22.** Concordancia combinada del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en los instrumentos BenchMark ULTRA PLUS frente a BenchMark ULTRA

Estado de BenchMark ULTRA PLUS HER2	Estado de BenchMark ULTRA HER2		Total
	Positiva	Negativa	
<b>Positiva</b>	154	22	176
<b>Negativa</b>	11	179	190
<b>Total</b>	165	201	366
	<b>n/N</b>	<b>% (CI del 95 %)</b>	
<b>Porcentaje de concordancia positiva</b>	154/165	93.3 (89.5, 96.9)	
<b>Porcentaje de concordancia negativa</b>	179/201	89.1 (85.1, 93.0)	
<b>Porcentaje de concordancia global</b>	333/366	91.0 (88.5, 93.7)	

#### Rendimiento de análisis en los casos gástricos

##### Estudios de precisión del instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark XT:

Se llevó a cabo un estudio de repetibilidad entre sesiones con el instrumento BenchMark XT en cinco sesiones que se realizaron durante un periodo de cinco días (no consecutivos). Cinco portaobjetos que contenían tres casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+ demostraron una concordancia del 100 % en el valor positivo o negativo de cada tejido.

Se llevó a cabo un estudio de repetibilidad entre sesiones con el instrumento BenchMark XT en 28 portaobjetos que contenían tres casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+. La puntuación de todos los casos era equivalente al valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

Se evaluó la repetibilidad entre plataformas en tres instrumentos BenchMark XT. En estas sesiones, los 30 portaobjetos de dos bloques diferentes con varios tejidos que contenían tres casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+ obtuvieron una puntuación equivalente en el valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

Se evaluó la repetibilidad entre plataformas en tres instrumentos BenchMark ULTRA. En estas sesiones, los 15 portaobjetos de un bloque de varios tejidos obtuvieron una puntuación equivalente en el valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

Se evaluó la repetibilidad entre plataformas en tres instrumentos BenchMark XT y tres instrumentos BenchMark ULTRA. En estas sesiones, los 30 portaobjetos de un bloque de varios tejidos obtuvieron una puntuación equivalente en el valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

##### Comparativa entre *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit con casos gástricos

El clon 4B5 se utilizó para llevar a cabo una prueba comparativa entre kits de detección en dos instrumentos (el instrumento BenchMark XT y el instrumento BenchMark ULTRA) con *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. La prueba se realizó con doscientos diez casos de tejido. Los portaobjetos con tinción se evaluaron para asignar una puntuación clínica positiva o negativa.

Los índices de aceptabilidad de la morfología y del fondo fueron del 100 % tanto en los kits de detección como en los instrumentos. En las tablas que aparecen a continuación se presentan las comparaciones directas de las evaluaciones clínicas positivas y negativas entre los kits de detección en cada instrumento.

**Tabla 23.** Evaluación clínica de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	21	0	21
Negativa	0	189	189
Total	21	189	210
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
Porcentaje de concordancia positiva	21/21	100	
Porcentaje de concordancia negativa	189/189	100	
Porcentaje de concordancia global	210/210	100	

**Tabla 24.** Comparación de la evaluación clínica en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Instrumento BenchMark XT con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	Instrumento BenchMark ULTRA con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	20	1	21
Negativa	0	189	189
Total	20	190	210
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	20/20	100 (83.9-100)	
Porcentaje de concordancia negativa	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Porcentaje de concordancia global	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

#### Reproducibilidad entre laboratorios del clon 4B5 en el carcinoma gástrico:

El estudio se llevó a cabo en tres sitios de prueba. Las muestras se seleccionaron para su incorporación al estudio en función de la puntuación clínica de IHC del clon 4B5, de forma que hubiera más o menos la misma cantidad de casos positivos (3+) que negativos (0, 1+). Además, se estudiaron un máximo de cuatro casos de cáncer gástrico cualificados con 2+.

En los tres sitios se emplearon un instrumento BenchMark XT y un instrumento BenchMark ULTRA para llevar a cabo cuatro sesiones de tinción en cada instrumento. Se aleatorizó la tinción de los casos mediante un proceso de aleatorización estratificada que asignaba los casos de forma que cada sesión contuviera casos que representasen todas las categorías de puntuación de HER2 en el cáncer gástrico. Las sesiones de cada instrumento en cada uno de los sitios contenían los mismos casos. En cada sitio, se tiñó un portaobjetos de cada caso con el clon 4B5 y otro portaobjetos del mismo caso con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark ULTRA. Un segundo par de portaobjetos del mismo caso se tiñó de forma parecida con el instrumento BenchMark XT en cada sitio. Un lector cualificado de cada sitio asignó la puntuación a los portaobjetos del caso con las puntuaciones clínicas de IHC de cada muestra establecidas con anterioridad enmascaradas.

La concordancia global de todos los casos que se podían evaluar fue del 100 % en las tres comparaciones entre sitios en el instrumento, BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark XT. La concordancia global entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark XT de los casos que se podían evaluar fue del 100 % en cada uno de los tres sitios. Los índices de aceptabilidad de fondo y morfología de todos los casos fueron del 100 % en ambos instrumentos en los Sitios A y C y > 95 % en ambos instrumentos en el Sitio B. Consulte las tablas que aparecen a continuación.

**Tabla 25.** Concordancia global de la evaluación clínica entre sitios: carcinoma gástrico, todos los casos que se podían evaluar.

Instrumento BenchMark ULTRA	Porcentaje de concordancia global
Sitio A frente a Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)
Sitio A frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)
Sitio B frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)
Instrumento BenchMark XT	Porcentaje de concordancia global
Sitio A frente a Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)
Sitio A frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)
Sitio B frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)

**Tabla 26.** Concordancia global de la evaluación clínica entre plataformas: carcinoma gástrico, todos los casos que se podían evaluar.

Instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT	Porcentaje de concordancia global
Sitio A: n/N (%) (CI del 95 %)	40/40 (100 %) (91.2-100)
Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	34/34 (100 %) (89.8-100)
Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	32/32 (100 %) (89.3-100)

**Tabla 27.** Índices de aceptabilidad de la morfología y la tinción de fondo: carcinoma gástrico, todos los casos.

Instrumento BenchMark ULTRA	Sitio A	Sitio B	Sitio C
Índices de aceptabilidad de la morfología	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Índices de aceptabilidad de la tinción de fondo	44/44 (100 %)	42/44 (95.5 %)	44/44 (100 %)
Instrumento BenchMark XT	Sitio A	Sitio B	Sitio C
Índices de aceptabilidad de la morfología	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)
Índices de aceptabilidad de la tinción de fondo	44/44 (100 %)	43/44 (97.7 %)	44/44 (100 %)

#### Estudio comparativo de los instrumentos BenchMark y BenchMark GX con el instrumento BenchMark XT: Carcinoma gástrico

Se tiñeron los portaobjetos con secciones de tres microarrays de tejido que contenían casos de carcinoma gástrico FFPE [unos 50 casos por microarray de tejido] en un instrumento BenchMark XT, un instrumento BenchMark y un instrumento BenchMark GX con sus respectivos protocolos de tinción recomendados para los kits *ultraView* Universal DAB Detection Kit y *VIEW* DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada microarray de tejido teñido con el reactivo Ig negativo. Un lector (anatomopatólogo) asignó la puntuación a los portaobjetos con tinción.

Los índices de concordancia global (y los límites inferiores de los intervalos de confianza del 95 % bilateral) de la tinción con el anticuerpo del clon 4B5, en función de la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron los siguientes: instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 98.0 % (94.2-99.3); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 97.4 % (93.6-99.0); instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit, 96.6 % (92.7-98.4); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit 95.9 % (91.8-98.0).

Los índices de concordancia positiva (y los límites inferiores de los intervalos de confianza del 95 % bilateral) de la tinción con el anticuerpo del clon 4B5, en función de la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron los siguientes: instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 91.7 % (64.4-98.5); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 78.6 % (52.4-92.4); instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit, 80.0 % (54.8-93.0); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit 73.3 % (48.0-89.1).

Los índices de concordancia negativa (y los límites inferiores de los intervalos de confianza del 95 % bilateral) de la tinción con el clon 4B5, en función de la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron los siguientes: instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 98.5 % (94.8-99.6); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit, 99.3 % (96.1-99.9); instrumento BenchMark frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit, 98.1 % (94.6-99.4); instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit 98.1 % (94.5-99.3). En las tablas que aparecen a continuación se muestra la presentación 2x2 de los índices de concordancia de cada comparación en función de la evaluación clínica (positivo, negativo).

**Tabla 28.** Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark frente al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	11	2	13
Negativa	1	133	134
Total	12	135	147
	<b>n/N</b>	<b>% (CI del 95 %)</b>	
Porcentaje de concordancia global	144/147	98.0 % (94.2-99.3)	
Porcentaje de concordancia positiva	11/12	91.7 % (64.6-98.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	133/135	98.5 % (94.8-99.6)	

**Tabla 29.** Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark GX frente a BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark GX	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	11	1	12
Negativa	3	140	143
Total	14	141	155
	<b>n/N</b>	<b>% (CI del 95 %)</b>	
Porcentaje de concordancia global	151/155	97.4 % (93.6-99.0)	
Porcentaje de concordancia positiva	11/14	78.6 % (52.4-92.4)	
Porcentaje de concordancia negativa	140/141	99.3 % (96.1-99.9)	

**Tabla 30.** Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark frente al instrumento BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	12	3	15
Negativa	3	156	159
Total	15	159	174
	<b>n/N</b>	<b>% (CI del 95 %)</b>	
Porcentaje de concordancia global	168/174	96.6 % (92.7-98.4)	
Porcentaje de concordancia positiva	12/15	80.0 % (54.8-93.0)	
Porcentaje de concordancia negativa	156/159	98.1 % (94.6-99.4)	

**Tabla 31.** Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark GX frente al instrumento BenchMark XT con *VIEW* DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark GX	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	11	3	14
Negativa	4	154	158
Total	15	157	172
	<b>n/N</b>	<b>% (CI del 95 %)</b>	
Porcentaje de concordancia global	165/172	95.9 % (91.8-98.0)	
Porcentaje de concordancia positiva	11/15	73.3 % (48.0-89.1)	
Porcentaje de concordancia negativa	154/157	98.1 % (94.5-99.3)	

### Estudios de precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Se llevó a cabo un estudio de repetibilidad entre sesiones con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS en 120 portaobjetos de 24 casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+. La puntuación de todos los casos era equivalente al valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

Se llevó a cabo un estudio de repetibilidad entre sesiones con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS en cinco sesiones que se realizaron en un periodo de cinco días (no consecutivos) con 240 portaobjetos de 24 casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+. La puntuación de todos los casos era equivalente al valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

Se evaluó la repetibilidad entre plataformas en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS. En estas sesiones se analizaron 144 portaobjetos de 24 casos de tejido gástrico con puntuaciones de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+. La puntuación de todos los casos era equivalente al valor positivo o negativo de cada tipo de tejido.

### Resultados de concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA PLUS y BenchMark ULTRA

Se tiñeron los portaobjetos con secciones de 94 casos de carcinoma gástrico FFPE en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y en un instrumento BenchMark ULTRA con sus respectivos protocolos de tinción recomendados para *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban casos de carcinoma gástrico positivo en HER2 de cada sesión de tinción y una segundo portaobjetos de prueba teñido con el reactivo Ig negativo. Un lector (anatomopatólogo) asignó la puntuación a los portaobjetos con tinción.

Los índices de concordancia global de la tinción con el anticuerpo anti-HER2 (4B5) en función del estado (positivo, negativo) fueron del 98.9 %. Los índices de concordancia positiva y negativa fueron del 100.0 % y del 98.4 % respectivamente. Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson. Los índices de aceptabilidad de fondo y morfología de todos los casos fueron del 100 % en ambos instrumentos.

### RENDIMIENTO CLÍNICO

#### Estudios comparativos del anticuerpo monoclonal de conejo del clon 4B5 con el anticuerpo monoclonal de ratón PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody en cáncer de mama

Se llevó a cabo un estudio comparativo del método para evaluar la relación del clon 4B5 con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody (anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)) y PathVysion HER2 FISH, siendo ambos pruebas diagnósticas homologadas previamente por la FDA. En el estudio participaron seis investigadores. Dos conjuntos de tres investigadores diferentes evaluaron dos cohortes independientes (Cohorte 1: n = 178, Cohorte 2: n = 144) mediante casos conocidos de cáncer de mama teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) y el clon 4B5. Los datos de FISH se obtuvieron de la historia clínica del paciente. Se creó una puntuación de consenso entre los tres lectores en cada anticuerpo para evitar la conocida variabilidad del lector que se produce en la puntuación de HER2.<sup>34,35,36</sup> Se evaluaron un

total de 322 casos. Los portaobjetos con tinción del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) se procesaron y se tiñeron según las instrucciones del fabricante que se especificaban en la hoja de datos del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11). Había transcurrido un periodo medio de aproximadamente un año entre la tinción y la lectura de los portaobjetos con tinción del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11). Dado que las puntuaciones de uno de los seis lectores se encontraban fuera del intervalo de confianza (CI), los datos de las dos cohortes se presentan a continuación:

#### Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras de los estudios de comparación

**Tabla 32.** Cohorte 1: puntuaciones consensuadas de IHC de tres anatomopatólogos.

Puntuación del clon 4B5	Puntuación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Total	31	37	75	143

Cohorte 1: Características de rendimiento en la presentación 3x3.

Concordancia global:  $(29+13+53)/143 = 66.4\%$  (CI del 95 % = 38.6 %, 59.7 %).

Cohorte 1: Características de rendimiento en la presentación 2x2 (las puntuaciones positivas (2+ y 3+) y negativas (0 y 1+) del anticuerpo HER-2 se presentan combinadas).

- Porcentaje de concordancia positiva:  $(29+2+24+13)/(31+37) = 100\%$  (CI del 95 % = 97.5 %-100 %).
- Porcentaje de concordancia Negativa:  $53/75 = 70.7\%$  (CI del 95 % = 58.5 %-80.1 %).

Concordancia global:  $(29+24+2+13+53)/143 = 84.7\%$  (CI del 95 % = 78.2 %-90.0 %).

**Tabla 33.** Cohorte 2: puntuaciones consensuadas de IHC de tres anatomopatólogos.

Puntuación del clon 4B5	Puntuación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Total	73	20	85	178

Cohorte 2: Características de rendimiento en la presentación 3x3.

Concordancia global:  $(72+12+80)/178 = 92.1\%$  (CI del 95 % = 80.1 %, 93.1 %).

Cohorte 2: Características de rendimiento en la presentación 2x2 (las puntuaciones positivas (2+ y 3+) y negativas (0 y 1+) del anticuerpo HER2 se presentan combinadas).

- Porcentaje de concordancia positiva:  $(72+12+1+1)/(73+20) = 92.5\%$  (CI del 95 % = 85.2 %-96.9 %).
- Porcentaje de concordancia Negativa:  $80/85 = 94.1\%$  (CI del 95 % = 86.8 %-98.1 %).

Concordancia global:  $(72+12+1+1+80)/178 = 93.3\%$  (CI del 95 % = 88.5 %-96.4 %).

**Tabla 34.** Cohorte 1: Puntuaciones consensuadas de IHC del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) por parte de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)	Resultado FISH		
	Positiva	Negativa	Total
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Total	86	58	144

Cohorte 1: Características de rendimiento de IHC y FISH del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva  $(32+32)/86 = 74.4\%$  (CI del 95 % = 63.8 %-83.2 %).
- Porcentaje de concordancia negativa:  $53/58 = 91.4\%$  (CI del 95 % = 80.9 %-97.1 %).

Concordancia global:  $(32+32+53)/144 = 81.2\%$  (CI del 95 % = 73.9 %-87.2 %).

**Tabla 35.** Cohorte 1: Puntuaciones consensuadas de IHC del clon 4B5 por parte de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación del clon 4B5	Resultado FISH		
	Positiva	Negativa	Total
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Total	86	58	144

Cohorte 1: Características de rendimiento del clon 4B5 y FISH en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva  $(55+25)/86 = 93.0\%$  (CI del 95 % = 87.9 %-96.3 %).
- Porcentaje de concordancia negativa:  $47/58 = 81.0\%$  (CI del 95 % = 73.4 %-86.0 %).

Concordancia global:  $(55+25+47)/144 = 88.2\%$  (CI del 95 % = 82.1 %-92.2 %).

**Tabla 36.** Cohorte 2: Puntuaciones consensuadas de IHC del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) por parte de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación del anticuerpo PATHWAY HER2 (CB11)	Resultado FISH		
	Positiva	Negativa	Total
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Total	93	85	178

Cohorte 2: Características de rendimiento de IHC y FISH del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva  $(72+13)/93 = 91.3\%$  (CI del 95 % = 85.0 %-96.7 %).
- Porcentaje de concordancia negativa:  $77/85 = 90.6\%$  (CI del 95 % = 83.9 %-96.3 %).

Concordancia global:  $(72+13+77)/178 = 91.0\%$  (CI del 95 % = 86.5 %-94.9 %).

**Tabla 37.** Cohorte 2: Puntuaciones consensuadas de IHC del clon 4B5 por parte de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación del clon 4B5	Resultado FISH		
	Positiva	Negativa	Total
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Total	93	85	178

Cohorte 2: Características de rendimiento del clon 4B5 y FISH en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva  $(72+11)/93 = 89.2\%$  (CI del 95 % = 82.5 %-95.1 %).
- Porcentaje de concordancia negativa:  $77/85 = 90.6\%$  (CI del 95 % = 84.0 %-96.4 %).

Concordancia global:  $(72+11+77)/178 = 90.0\%$  (CI del 95 % = 85.4 %-93.6 %).

#### Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras de los estudios de comparación

Dado que es un hecho que los diferentes anatomopatólogos pueden llevar a cabo distintas interpretaciones de los portaobjetos de inmunohistoquímica, tres anatomopatólogos analizaron cada una de las dos cohortes (un total de seis anatomopatólogos) para proceder a la lectura de todas las muestras. Se adjudicaron los resultados definitivos mediante una regla de dos de tres. A continuación se expone un resumen de los resultados variables que se obtuvieron por parte de los tres anatomopatólogos en cuanto a las muestras del estudio comparativo de cada cohorte.

**Tabla 38.** Cohorte 1: Puntuación del clon 4B5 de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación del clon 4B5		
	Investigador 1	Investigador 2	Investigador 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Total	174	178	178

Nota: Según la evaluación de los tres anatomopatólogos, en un total de tres muestras existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 0, 2+).

Muestra 1: Un anatomopatólogo asignó una puntuación de 2+, dos anatomopatólogos asignaron la puntuación 0.

Muestra 2: Un anatomopatólogo asignó una puntuación de 0, dos anatomopatólogos asignaron la puntuación 2+.

Muestra 3: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 1+ y el tercero, 2+.

**Tabla 39.** Cohorte 1: Puntuación de IHC del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Investigador 1	Investigador 2	Investigador 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Total	174	178	178

Nota: Según la evaluación de los tres anatomopatólogos, en un total de una muestra existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 1, 3+).

Muestra 1: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 1+, el segundo asignó 2+ y el tercero, 3+.

**Tabla 40.** Cohorte 2: Puntuación del clon 4B5 de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación del clon 4B5		
	Investigador 4	Investigador 5	Investigador 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Total	141	144	144

Nota: Según la evaluación de tres anatomopatólogos, en un total de seis muestras existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 0, 3+).

Muestra 1: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 0 y el tercero, 2+.

Muestra 2: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 1+, el segundo asignó 1+ y el tercero, 3+.

Muestra 3: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 2+ el tercer anatomopatólogo asignó 2+.

Muestras 4 y 5: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 2+ y el tercero, 2+.

Muestra 6: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 3+ y el tercero, 3+.

**Tabla 41.** Cohorte 2: Puntuación de IHC del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Investigador 4	Investigador 5	Investigador 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Total	144	144	144

Nota: Según la evaluación de tres anatomopatólogos, en un total de ocho muestras existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 0-2+).

Muestras 1-6: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 1+ y el tercero, 2+.

Muestras 7 y 8: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0, el segundo asignó 2+ y el tercero, 2+.

A continuación se propone un cómputo de los rangos de porcentajes de concordancia de los pares entre anatomopatólogos (tres pares por cada cohorte).

**Tabla 42.** Rangos en 2x2\* de la concordancia de los tres anatomopatólogos.

	Porcentaje de concordancia global	Porcentaje de concordancia positiva	Porcentaje de concordancia negativa
<b>Clon 4B5 frente al anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)</b>			
Cohorte 1	82.6-86.9 %	97.3-100.0 %	68.0 %-75.4 %
Cohorte 2	88.2-95.5 %	87.6-95.6 %	86.1-95.4 %
<b>Clon 4B5 frente a FISH</b>			

	Porcentaje de concordancia global	Porcentaje de concordancia positiva	Porcentaje de concordancia negativa
Cohorte 1	86.8-88.2 %	90.7-94.2 %	79.3-81.0 %
Cohorte 2	87.4-89.9 %	88.2-90.0 %	84.5-91.8 %
<b>Anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) frente a FISH</b>			
Cohorte 1	79.9-84.0 %	73.3-80.2 %	89.7-89.7 %
Cohorte 2	84.8%-93.3 %	86.7-92.5 %	82.7-94.1 %

\* 0, 1+ = Negativo. 2+ y 3+ = Positivo.

**Conclusiones:** Este estudio demuestra que existe una concordancia de importancia clínica (concordancia global entre los resultados positivos/negativos) entre el ensayo del clon 4B5 y el ensayo PATHWAY anti-HER2 (CB11), probando en consecuencia que el clon 4B5 de HER2 es una alternativa aceptable al anticuerpo CB11 que sirve como ayuda en la evaluación de las pacientes con cáncer de mama para las que se está planteando la posibilidad de administrar un tratamiento con trastuzumab (Herceptin). El estudio demuestra que los resultados de la expresión de HER2 que se obtienen con el ensayo de IHC con el clon 4B5 son equivalentes a los resultados del estado del gen HER2 que se obtienen mediante análisis FISH.

#### Comparación del clon 4B5 con HercepTest en cáncer gástrico humano:

Se llevó a cabo un estudio externo y enmascarado para comparar el rendimiento de la tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark XT con la del ensayo Dako HercepTest. Se estudiaron dos cohortes de muestras, (1) microarrays de tejido (TMA) de creación reciente que contenían 248 casos de cáncer gástrico (se descubrió posteriormente que seis de los casos eran duplicados y se eliminaron) y (2) un subconjunto de 183 muestras de ensayo clínico del ensayo Trastuzumab for Gastric Cancer (ToGA, por las siglas inglesas de Trastuzumab para cáncer gástrico) que evaluaba el estado de HER2 y el resultado clínico en pacientes que habían recibido tratamiento con Herceptin (trastuzumab). Se tiñeron los casos en el laboratorio con el clon 4B5 y HercepTest. Se incorporaron a la comparación un total de 431 casos que se pudieron evaluar mediante ambos ensayos. Un anatomopatólogo asignó la puntuación a los casos con una escala de 0/1+, 2+ y 3+. Los casos positivos debían tener una puntuación de 2+ y 3+ y los negativos, de 0 y 1+. En la Tabla 43 se recogen los índices de concordancia entre el clon 4B5 y HercepTest de las dos cohortes que se estudiaron.

**Tabla 43.** Datos de concordancia del clon 4B5 (IHC) frente a HercepTest en carcinoma gástrico.

Origen del tejido	Porcentaje de concordancia global (CI del 95 %)	Porcentaje de concordancia positiva (CI del 95 %)	Porcentaje de concordancia negativa (CI del 95 %)
TMA <sup>a</sup> y ToGA <sup>b</sup>	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

Los resultados de IHC se consideraban positivos en anticuerpo (2+ y 3+) y negativos (0+ y 1+).

<sup>a</sup> TMA: muestras de tejido de microarray

<sup>b</sup> ToGA: muestras de ensayo clínico del ensayo ToGA

#### Comparación de métodos con el ensayo de inscripción en los estudios de PERJETA (pertuzumab) y KADCYLA (trastuzumab emtansina) en carcinoma de mama

La equivalencia con los ensayos de inscripción en los estudios de PERJETA y KADCYLA se determinó mediante la tinción de las muestras del ensayo con el ensayo del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Se tiñeron 2753 muestras que se habían evaluado para el ensayo PERJETA y 99 muestras evaluadas para el ensayo KADCYLA con el anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5). Se determinaron los índices de concordancia (PPA, NPA y OPA). Los CI del 95 % (intervalos de confianza del 95 % bilaterales) se calcularon mediante el método de puntuación.

**Tabla 44.** Concordancia de los ensayos del clon 4B5 y Dako en cuanto al estado de HER2 en todos los sujetos HER2 cuya evaluación fue posible. Los sujetos que pudieron someterse a evaluación mediante IHC obtuvieron un estado de HER2 Positivo o Negativo que se determinó mediante el clon 4B5 y el ensayo de IHC de inscripción.

Estudio	Puntuación del clon 4B5 <sup>b</sup>	Estado Dako HER2 <sup>a,b</sup>		
		Positiva	Negativa	Total
PERJETA y KADCYLA	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Total	2558	272	2830
	Porcentaje de concordancia positiva n/N (%) (CI del 95 %)	2380/2558 (93.0) (92.0-94.0)		
	Porcentaje de concordancia negativa n/N (%) (CI del 95 %)	257/272 (94.5) (91.1-96.6)		
Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	2637/2830 (93.2) (92.2-94.1)			

<sup>a</sup> Positiva = IHC positiva y/o ISH amplificada. Negativa = IHC negativa y ISH no amplificada o ISH no amplificada y IHC no positiva.

<sup>b</sup> IHC: Positiva = 3+; Negativa = 0, 1+ o 2+.

**Tabla 45.** Concordancia de los ensayos del clon 4B5 y Dako en cuanto al estado de IHC en todos los sujetos cuya evaluación mediante IHC fue posible. Los sujetos que pudieron someterse a evaluación mediante IHC obtuvieron un estado de HER2 Positivo o Negativo que se determinó mediante el clon 4B5 y el ensayo de IHC de inscripción.

Estudio	Estado del clon 4B5 <sup>a</sup>	Estado Dako HercepTest <sup>a</sup>		
		Positiva	Negativa	Total
PERJETA y KADCYLA	Positiva	2330	65	2395
	Negativa	21	414	435
	Total	2351	479	2830
	Porcentaje de concordancia positiva n/N (%) (CI del 95 %)	2330/2351 (99.1) (98.6-99.4)		
	Porcentaje de concordancia negativa n/N (%) (CI del 95 %)	414/479 (86.4) (83.1-89.2)		
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	2744/2830 (97.0) (96.3-97.5)		
PERJETA	Positiva	2267	63	2330
	Negativa	10	399	409
	Total	2277	462	2739
	Porcentaje de concordancia positiva n/N (%) (CI del 95 %)	2267/2277 (99.6) (99.2-99.8)		
	Porcentaje de concordancia negativa n/N (%) (CI del 95 %)	399/462 (86.4) (82.9-89.2)		
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	2666/2739 (97.3) (96.7-97.9)		
KADCYLA	Positiva	63	2	65
	Negativa	11	15	26
	Total	74	17	91
	Porcentaje de concordancia positiva n/N (%) (CI del 95 %)	63/74 (85.1) (75.3-91.5)		
	Porcentaje de concordancia negativa n/N (%) (CI del 95 %)	15/17 (88.2) (65.7-96.7)		
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	78/91 (85.7) (77.1-91.5)		

<sup>a</sup> Positiva = 3+; Negativa = 0, 1+ o 2+.

**Tabla 46.** Concordancia de los ensayos del clon 4B5 y Dako en cuanto a la puntuación de IHC en todos los sujetos cuya evaluación mediante IHC fue posible. Los sujetos que pudieron someterse a evaluación mediante IHC obtuvieron un estado de HER2 Positivo o Negativo que se determinó mediante el clon 4B5 y el ensayo de IHC de inscripción.

Estudio	Puntuación del clon 4B5	Puntuación de Dako HercepTest			
		3+	2+	0/1+	Total
PERJETA y KADCYLA	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Total	2351	325	154	2830
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	2703/2830 (95.5) (94.7-96.2)			
PERJETA	3+	2267	62	1	2330
	2+	9	226	13	248
	0/1+	1	24	136	161
	Total	2277	312	150	2739
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	2629/2739 (96.0) (95.2-96.7)			
KADCYLA	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Total	74	13	4	91
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) (CI del 95 %)	74/91 (81.3) (72.1-88.0)			

**Tabla 47.** Aceptabilidad de la tinción del clon 4B5. Sujetos sometidos a pruebas de IHC. La tinción IHC se considera aceptable si se puede asignar una puntuación de IHC válida (0, 1+, 2+ o 3+). Entre los motivos que pueden convertir la tinción en inaceptable figuran un control negativo inaceptable, la pérdida del tejido, cantidad de tumor insuficiente, tinción de fondo inaceptable y una morfología inaceptable.

Parámetro	PERJETA	KADCYLA	PERJETA y KADCYLA
Cantidad de pruebas IHC iniciales	2753	99	2852
Aceptabilidad de la tinción inicial n/N (%) (CI del 95 %)	2708/2753 (98.4) (97.8, 98.8)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2800/2852 (98.2) (97.6, 98.6)
Cantidad de pruebas IHC repetidas	40	0	40

Parámetro	PERJETA	KADCYLA	PERJETA y KADCYLA
Aceptabilidad de la tinción final n/N (%) (CI del 95 %)	2746/2753 (99.7) (99.5, 99.9)	92/99 (92.9) (86.1, 96.5)	2838/2852 (99.5) (99.2, 99.7)

## RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de las sesiones de control positivo que se han analizado en la misma sesión y el mismo instrumento para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo es negativo, debe asegurarse de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si se ha etiquetado correctamente el portaobjetos, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado en la misma sesión y el mismo instrumento para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, la conservación y la fijación.
- Si no se ha eliminado toda la parafina, es posible que no se presente la tinción. El procedimiento de desparafinado debería repetirse.
- Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, se debe repetir la sesión reduciendo el tiempo de incubación para obtener la intensidad de tinción deseada.
- Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, debe comprobar que los portaobjetos tienen carga positiva.
- Si se observan tinciones nucleares y citoplasmáticas en la mucosa normal cercana al área del tumor del carcinoma gástrico que generan confusión a la hora de interpretar la tinción de membrana, el caso se debe analizar mediante ISH.
- Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento de tinción, el Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

## REFERENCIAS

- 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.
- Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egrf, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697.
- Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to HER2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2019;90(1):44-54.
- Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
- Van Cutsem E, Bang YJ, Feng Yi F, et al. HER2 Screening Data from Toga: Targeting HER2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):476-484.
- 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](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.
- Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69: 57-58.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- 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.
- 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.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
- 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.
- Hoffmann M, et al. *Histopathology*. 2008;52:797-805.
- Rüschhoff 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66(4):194-199.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
- 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.

**NOTA:** En este documento se ha usado el punto como separador decimal para marcar el borde entre la parte entera y la parte fraccionaria de los numerales con decimales. No se han usado separadores para las unidades de millar.

El resumen de los aspectos de seguridad y rendimiento se puede ver a continuación:

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

### Símbolos

Ventana usa los siguientes símbolos y signos además de los indicados en la norma ISO 15223-1 (para EE. UU.: consulte en [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com) la definición de los símbolos usados):



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el producto sanitario en la Unión Europea

### HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
D	Se han actualizado las secciones Uso previsto, Resumen y explicación, Importancia clínica, Principio del procedimiento, Material suministrado, Materiales necesarios pero no suministrados, Preparación de muestras, Advertencias y precauciones, Procedimientos de control de calidad, Control de tejido positivo, Interpretación de las tinciones y resultados previstos, Rendimiento de análisis y Referencias. Incorporación de BenchMark ULTRA PLUS.

### PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY, *ultraView* y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche. Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

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

### INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

[www.roche.com](http://www.roche.com)

