

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx

REF 790-7167
09670564001

IVD 50

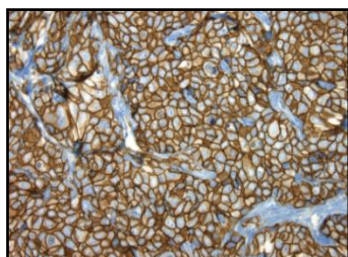


Figura 1. Tinción con VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody en carcinoma de mama.

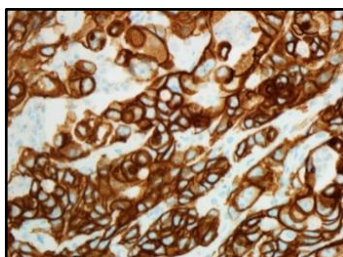


Figura 2. Tinción con VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx en carcinoma gástrico.

USO PREVISTO

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx está destinado a su uso para la detección semicuantitativa del antígeno HER2 mediante inmunohistoquímica (IHC) en secciones de tejido de carcinoma de mama, carcinoma gástrico o cáncer de las vías biliares (BTC, es decir, adenocarcinoma de vesícula biliar, colangiocarcinoma intrahepático y colangiocarcinoma extrahepático) fijado con formol y embebido en parafina, teñidas en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

El producto de IHC se ha indicado como prueba diagnóstica para ayudar en la identificación de pacientes que pueden cumplir los requisitos de idoneidad para recibir los siguientes tratamientos de acuerdo con el etiquetado terapéutico homologado:

- Pacientes con carcinoma de mama para recibir tratamiento con trastuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/ISH amplificado), pertuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/ISH amplificado), trastuzumab emtansina (IHC 3+ o IHC 2+/ISH amplificado) o trastuzumab deruxtecán (IHC 0 con tinción de membrana, IHC 1+ o IHC 2+/ISH no amplificado).
- Pacientes con carcinoma gástrico para recibir tratamiento con trastuzumab (IHC 3+ o IHC 2+/ISH amplificado).
- Pacientes con BTC para recibir tratamiento con zanidatamab (IHC 3+).

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

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (VENTANA HER2 (4B5) Assay) está diseñado para detectar la proteína HER2 mediante inmunohistoquímica (IHC). La proteína HER2 (también conocida como oncoproteína c-erbB-2) es miembro de la subfamilia de receptores transmembrana tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico que participan en el crecimiento de las células, su diferenciación y su supervivencia.^{1,6} La sobreexpresión de proteína provocada por la amplificación del gen HER2 impulsa la oncogénesis en el cáncer de mama.¹ El exceso de HER2 en la membrana celular fomenta la transducción de la señal, lo que aumenta la proliferación y la diferenciación y, en última instancia, la formación de tumores.^{1,3,6} El desequilibrio de la señalización también confiere propiedades de supervivencia a la célula neoplásica mediante la reducción de las vías apoptóticas.⁴ La sobreexpresión del receptor también conduce al aumento de la expresión de variantes de HER2 hiperactivas producidas a partir de la iniciación traslacional alternativa o la segmentación proteolítica (eliminación) del dominio extracelular,^{5,6} lo que favorece la progresión y la metástasis tumoral.^{5,6,7}

En muchos tipos de tumores, predominantemente neoplasias malignas de origen epitelial, se observa una sobreexpresión de la proteína HER2, la amplificación del gen HER2 o

ambas.⁸ HER2 es un biomarcador reconocido para la selección de pacientes con tratamiento basado en HER2 en el cáncer de mama (Figura 1) y el cáncer gástrico/gastroesofágico (Figura 2).³ Se ha documentado la asociación entre la expresión/amplificación de HER2 y el beneficio clínico con el tratamiento centrado en HER2 en diversos tipos de cánceres.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo VENTANA HER2 (4B5) Assay contiene un anticuerpo monoclonal de conejo que se une a HER2 en secciones de tejido FFPE. El anticuerpo específico se puede localizar con un conjugado de anticuerpo secundario y HRP (*ultraView Universal DAB Detection Kit*). El complejo específico de anticuerpo-enzima se puede visualizar a través del precipitado del producto de reacción enzimático. Cada paso se incuba con tiempos y temperaturas específicos. 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 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 positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay, 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 HER2 (4B5) RxDx para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de los procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

VENTANA HER2 (4B5) Assay contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 ml de anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay 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 ácida sódica 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 HER2 (4B5) es un IgG de conejo diluido de sobrenadantes de cultivo tisular.

Consulte la hoja de datos del kit de detección VENTANA correspondiente para obtener descripciones detalladas de los siguientes aspectos: 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 kits de detección VENTANA, ni componentes auxiliares, incluyendo portaobjetos de control de tejido negativos y positivos.

Puede que no todos los productos que aparecen en la hoja de datos estén 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. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView Universal DAB Detection Kit* (n.º de cat. 760-500 / 05269806001)
5. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)

8. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
11. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (n.º de cat. 760-2037 / 05266769001)
13. Equipo de laboratorio de uso general
14. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Tras la recepción y cuando no se utilice, consérvase de 2-8 °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 %.⁹ La cantidad que debe utilizarse es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación del tejido se debe llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C).⁹ Los portaobjetos deberían teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

Se deben realizar cortes de 4 µm de grosor y colocarse en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Los tejidos deben secarse al aire colocándolos a temperatura ambiente durante la noche.⁹ Los portaobjetos deberían teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

Se recomienda analizar controles positivos y negativos a la vez que las muestras desconocidas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
4. 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.
5. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{10,11}
6. 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.
7. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
8. 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 NaN3 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 azida en las tuberías.¹² Es posible que se presenten reacciones alérgicas sistémicas en personas con mayor sensibilidad.
9. 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 navifyportal.roche.com.

10. Consultar a las autoridades locales y/o estatales sobre el método de eliminación recomendado.
11. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del UE GHS. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
12. 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 la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3 y la Tabla 4 para ver los protocolos de tinción recomendados en función del tipo de tejido, la indicación y los instrumentos correspondientes.

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

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden visualizar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario del instrumento. Consulte la hoja de datos de *ultraView* Universal DAB Detection Kit apropiada para obtener más información sobre los procedimientos de tinción de IHC.

Para obtener más información sobre el uso adecuado de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociada al N/P 790-7167.

NOTA: Cuando se realiza el cribado de pacientes para una evaluación potencial de HER2 ultrabaja o HER2 baja en el cáncer de mama, debe utilizarse el procedimiento de tinción indicado en la Tabla 1. Si la intención es notificar el estado de positividad de HER2, se deben emplear los procedimientos para el cáncer de mama que se recogen en la Tabla 1 o en la Tabla 3. El procedimiento de la Tabla 1 se recomienda para garantizar la utilización más exhaustiva de los resultados en el cáncer de mama y se debe utilizar cuando se evalúan niveles de HER2 ultrabaja y HER2 baja. Para el estado de positividad de HER2 en BTC, utilice la Tabla 2. Para el estado de positividad de HER2 en cáncer gástrico, utilice la Tabla 4.

Procedimiento de tinción para todas las evaluaciones de HER2 en muestras de mama

El protocolo de tinción y el procedimiento que se recogen en la Tabla 1 son adecuados para su uso en todos los casos de cribado de HER2 de carcinomas de mama y se debe emplear durante la evaluación de las muestras del paciente para valorar los posibles tratamientos dirigidos a niveles de HER2 ultrabaja o HER2 baja. No respetar los protocolos de tinción recomendados puede dar lugar a muestras teñidas con HER2 inaceptables y a la obtención de una puntuación HER2 distinta, especialmente en casos con una expresión de HER2 baja (IHC 1+) y expresión de HER2 ultrabaja (IHC 0 con tinción de membrana). La reducción o ampliación de los tiempos de acondicionamiento celular suelen producir muestras con tinción HER2 con puntuaciones HER2 alteradas, lo que puede dar lugar a la toma de decisiones poco acertadas en el tratamiento de los pacientes. El procedimiento de tinción especificado en la Tabla 1 no permite modificar el acondicionamiento celular ni el tiempo de incubación del anticuerpo para reducir este riesgo, ya que se trata del único protocolo de tinción validado para su uso en la evaluación de muestras de pacientes con posibles niveles de HER2 ultrabaja y HER2 baja.

Tabla 1. Protocolo de tinción para VENTANA HER2 (4B5) Assay para todas las evaluaciones de HER2 en muestras de mama incluyendo una evaluación potencial de niveles de HER2 ultrabaja y HER2 baja en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Procedimiento de tinción	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Anticuerpo (primario)*	VENTANA HER2 4B5 Ab: 16 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab: 16 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab: 12 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:12 min

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

*Esta es una condición programada previamente y el usuario no puede seleccionar los pasos.

Procedimiento de tinción para evaluación de la positividad en HER2 para muestras de BTC

El procedimiento y el protocolo de tinción que se recogen en la Tabla 2 están indicados para su uso en la evaluación de la positividad en HER2 para muestras de BTC. No respetar los protocolos de tinción recomendados puede dar lugar a muestras teñidas con HER2 inaceptables y a la obtención de una puntuación HER2 distinta. La reducción o ampliación de los tiempos de acondicionamiento celular suelen producir muestras con tinción HER2 con puntuaciones HER2 alteradas, lo que puede dar lugar a la toma de decisiones poco acertadas en el tratamiento de los pacientes. El procedimiento de tinción especificado en la Tabla 2 no permite modificar el acondicionamiento celular ni el tiempo de incubación del anticuerpo para reducir este riesgo, ya que se trata del único protocolo de tinción validado para su uso en la evaluación de la positividad en HER2 para muestras de BTC.

Nota: No se han evaluado las características para BTC en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. No se deben teñir muestras de BTC con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

Tabla 2. Protocolo de tinción para VENTANA HER2 (4B5) Assay para la evaluación de HER2 en tejido de BTC en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Procedimiento de tinción	GX VENTANA HER2 4B5	XT VENTANA HER2 4B5	ULTRA VENTANA HER2 4B5
Anticuerpo (primario)*	VENTANA HER2 4B5 Ab: 16 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab: 16 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:16 min	VENTANA HER2 4B5 Ab: 12 min o CONFIRM Neg Ctl Rbt Ig:12 min
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

*Esta es una condición programada previamente y el usuario no puede seleccionar los pasos.

Procedimientos de tinción alternativos que únicamente se aplican para la evaluación de la posible positividad en HER2 en muestras de mama o gástricas

Los procedimientos y los protocolos de tinción que se recogen en la Tabla 3 y la Tabla 4 están indicados para su uso en la evaluación de la positividad de HER2 en tejidos gástricos y de mama definidos como la sobreexpresión de proteína, puntuación de IHC 3+ o 2+ (con un estado de HER2 amplificado confirmado) y no para evaluar muestras de tejido de BTC ni de tejido de mama con expresión de HER2 ultrabaja definida como puntuación de IHC 0 (con tinción de membrana) o expresión de HER2 baja definida como puntuación de IHC 1+ o 2+ (con un estado de HER2 no amplificado confirmado). Los tiempos de incubación del anticuerpo y de acondicionamiento celular recomendados que se especifican en la Tabla 3 y en la Tabla 4 no están bloqueados y los puede modificar el usuario. Algunas de las posibles razones que existen para querer modificar los parámetros son la variación en la fijación o el procesamiento de los tejidos (al no haberse respetado la fijación ni el procesamiento recomendado de las muestras), diferencias en el instrumento o las condiciones generales del laboratorio y la preferencia del lector. Para

obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances». ¹³ Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

Tabla 3. Protocolo de tinción para VENTANA HER2 (4B5) Assay con ultraView Universal DAB Detection Kit en muestras de mama en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA o BenchMark ULTRA PLUS
Procedimiento de tinción	Procedimiento de tinción ultraView DAB	Procedimiento de tinción ultraView DAB	Procedimiento de tinción ultraView DAB
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Cell Conditioning (desenmascaramient o 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		

Tabla 4. Protocolo de tinción para VENTANA HER2 (4B5) Assay con ultraView DAB Detection Kit en muestras gástricas en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark GX	BenchMark XT	BenchMark ULTRA
Procedimiento de tinción	Procedimiento de tinción ultraView DAB	Procedimiento de tinción ultraView DAB	Procedimiento de tinción ultraView DAB
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Cell Conditioning (desenmascaramient o 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		

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Controles 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 instrumento o del método de procesamiento que se utiliza para la tinción de los portaobjetos con VENTANA HER2 (4B5). Estos cuatro controles de líneas celulares se caracterizan por la hibridación in situ para el número de copia del gen, Tabla 5. 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 5. 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 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 analizar 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 VENTANA HER2 (4B5) Assay que se lleven a cabo. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que la muestra 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. Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. 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 VENTANA HER2 (4B5) Assay 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, fijado, procesado y embebido de forma idéntica a 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 corríjalo; 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 Checklist¹⁴, CLSI Approved Guideline¹⁵ o todos ellos). Estos procedimientos de control de calidad deben repetirse para cada nuevo lote de anticuerpo nuevo o cuando se produzca un cambio en 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 TINCIIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de inmunotinción automatizada VENTANA hace que un producto de reacción de color marrón (DAB) se precipite en los sitios del antígeno localizados por el VENTANA HER2 (4B5) Assay. 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 oscuro, más clara o más oscura, en los núcleos celulares. Una contratinción incompleta o excesiva puede comprometer la correcta interpretación 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 el antígeno 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) Antibody en carcinoma de mama

A continuación se exponen unas tablas de referencia rápida sobre los criterios de tinción. Consulte la Guía de interpretación de la tinción del cáncer de mama de VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (P/N 162539EN) para obtener una descripción más detallada con imágenes de la tinción con el VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Tabla 6. Criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama cuando se utiliza el procedimiento de tinción indicado en la Tabla 1.

Patrón de tinción	Puntuación de HER2 (4B5) (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Uso del procedimiento de tinción de la Tabla 1: Estado de HER2	Terapia
No se observa tinción de membrana*	IHC 0 <u>sin</u> tinción de membrana	HER2 nula	Ninguno
Cualquier tinción de la membrana superior a 0 y menor o igual al 10 % o menos de las células cancerosas**,**,*	IHC 0 <u>con</u> tinción de membrana	Nivel de expresión de HER2 ultrabaja	ENHERTU® (trastuzumab deruxtecan)
Tinción difusa y parcial de la membrana en porcentajes superiores al 10 % de células cancerosas*	IHC 1+	Bajo nivel de expresión de HER2	
Tinción débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 2+**** <i>Prueba condicionada: HER2 no amplificado</i>	Bajo nivel de expresión de HER2	
Tinción débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 2+**** <i>Prueba condicionada: HER2 amplificado</i>	Sobreexpresión/ positivo en HER2	HERCEPTIN® (trastuzumab), PERJETA® (pertuzumab), KADCYLA® (trastuzumab emtansina)
	IHC 3+	Sobreexpresión/ positivo en HER2	
Tinción intensa completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 3+	Sobreexpresión/ positivo en HER2	

*Es recomendable revisar a 40x para saber si hay presencia o ausencia de cualquier tinción, ya sea parcial o difusa.

**Es recomendable que un anatomopatólogo vuelva a efectuar una lectura de los casos clasificados como de expresión de HER2 nula o de HER2 ultrabaja con porcentaje de células tumorales (%TC) ≤ 5 %.

***En la categoría «IHC 0 con tinción de membrana» de HER2 ultrabaja, la tinción membranosa parcial se suele presentar difusa, pero puede mostrar intensidades más fuertes. Estos casos, que son poco frecuentes, se califican como HER2 ultrabaja si no reúnen los requisitos para obtener una puntuación más alta. Consulte la guía de interpretación para casos de ejemplo.

****Se recomienda llevar a cabo una prueba condicionada para evaluar la amplificación del gen según las directrices de ASCO/CAP.

Tabla 7. Criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) RxDx Assay en carcinoma de mama cuando se utiliza el procedimiento de tinción de membrana indicado en la Tabla 3.

Patrón de tinción	Puntuación de HER2 (4B5) (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Uso del procedimiento de tinción de la Tabla 3: Estado de HER2	Terapia
No se observa tinción de membrana o bien Tinción difusa y parcial de la membrana en el 10 % o porcentajes inferiores de células cancerosas	IHC 0	Negativo en HER2	Ninguno
Tinción difusa y parcial de la membrana en porcentajes superiores al 10 % de células cancerosas	IHC 1+	Negativo en HER2	
Tinción débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 2+* <i>Prueba condicionada: HER2 no amplificado</i>	Negativo en HER2	
Tinción débil a moderada completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 2+* <i>Prueba condicionada: HER2 amplificado</i>	Sobreexpresión/ positivo en HER2	HERCEPTIN® (trastuzumab), PERJETA® (pertuzumab), KADCYLA® (trastuzumab emtansina)
	IHC 3+	Sobreexpresión/ positivo en HER2	
Tinción intensa completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	IHC 3+	Sobreexpresión/ positivo en HER2	

* Se recomienda llevar a cabo una prueba condicionada para evaluar la amplificación del gen según las directrices de ASCO/CAP

Convenciones de puntuación para la interpretación del anticuerpo VENTANA anti-HER2 (4B5) en carcinoma gástrico y cáncer de las vías biliares

Para que los carcinomas gástricos y el BTC 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 (IHC 2+ o superior [carcinoma gástrico] o IHC 3+ [BTC] en una escala de 0 a 3+) y al porcentaje de células tumorales positivas. La tinción debe localizarse en la membrana celular pero no tiene que ser completamente circunferencial, ya que la tinción basolateral se observa con regularidad y debe considerarse para 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 y el BTC, el porcentaje de células tumorales positivas depende de si la muestra procede de una biopsia (≥ 5 de células de cohesión) o de una extirpación quirúrgica de la muestra (≥ 10 %).

A la hora de establecer las directrices para la puntuación de la inmunohistoquímica de HER2 en el cáncer gástrico y el BTC, 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.¹⁶

Se ha registrado el uso de tinción citoplasmática difusa con o sin tinción nuclear en cáncer gástrico y BTC.¹⁷ Solo debe usarse la tinción membranosa en la determinación de la expresión de proteína HER2 en el cáncer gástrico y BTC.

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 de unión gastroesofágica. La naturaleza de esta tinción nuclear y tinción citoplasmática se desconoce actualmente. 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 para cáncer gástrico VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (P/N 142372EN) o la Guía de interpretación para cáncer de las vías biliares VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx (P/N 23357EN) para obtener una descripción más detallada con microfotografías de la tinción con VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Tabla 8. Criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma gástrico cuando se utiliza el procedimiento de tinción indicado en la Tabla 4.

Patrón de tinción: muestra de extirpación quirúrgica	Patrón de tinción: muestra de biopsia	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2	Terapia
No se presenta reactividad o reactividad membranosa en < 10 % de las células tumorales	No hay reactividad ni reactividad membranosa en ninguna célula tumoral	IHC 0	Negativo en HER2	Ninguno
Reactividad membranosa difusa o apenas perceptible en ≥ 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	IHC 1+		
Reactividad membranosa de débil a moderada, completa, basolateral o lateral en ≥ 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	IHC 2+** Prueba condicionada: HER2 no amplificado	HER2 positiva	HERCEPTIN® (trastuzumab)
		IHC 2+** Prueba condicionada: HER2 amplificado		
Reactividad membranosa fuerte, completa, basolateral o lateral en ≥ 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	IHC 3+		

* ≥ 5 células de cohesión

**Se recomienda reflejar en ISH

Tabla 9. Criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) Assay en cáncer de las vías biliares cuando se utiliza el procedimiento de tinción indicado en la Tabla 2.

Patrón de tinción: muestra de extirpación quirúrgica	Patrón de tinción (muestra de biopsia*)	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2	Terapia
No se presenta reactividad o reactividad membranosa en < 10 % de las células tumorales	No hay reactividad ni reactividad membranosa en ninguna célula tumoral	IHC 0	Negativo en HER2	Ninguno
Reactividad membranosa difusa o apenas perceptible en ≥ 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 clústeres tumorales con tinción	IHC 1+		

Patrón de tinción: muestra de extirpación quirúrgica	Patrón de tinción (muestra de biopsia*)	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2	Terapia
Reactividad membranosa de débil a moderada, completa, basolateral o lateral en ≥ 10 % de las células tumorales	Grupo de clústeres tumorales** con reactividad membranosa de débil a moderada, completa, basolateral o lateral independientemente del porcentaje de células tumorales con tinción	IHC 2+		
Reactividad membranosa fuerte, completa, basolateral o lateral en ≥ 10 % de las células tumorales	Grupo de clústeres tumorales** con reactividad membranosa fuerte, completa, basolateral o lateral independientemente del porcentaje de células tumorales con tinción	IHC 3+	HER2 positiva	ZIIHERA® (zanidatamab)

*Las muestras de biopsia incluyen muestras obtenidas por endoscopia, punción (pinzas) y biopsia con aguja gruesa

**≥ 5 células de cohesión

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 de la manipulación y el procesamiento del tejido antes de 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 incompleta o excesiva puede comprometer la correcta interpretación 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. La posibilidad 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 de antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.¹⁸ 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.¹⁹
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.²⁰

10. Como ocurre en todas las pruebas de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno en concreto, no necesariamente que el antígeno no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

Limitaciones específicas

1. Este anticuerpo se ha optimizado, tal y como se indica en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3 y la Tabla 4, para los instrumentos BenchMark y las sustancias químicas de detección. No respetar los protocolos de tinción recomendados en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3 y la Tabla 4 puede dar lugar a muestras Negative Reagent Control (NRC) inaceptables y a la obtención de muestras teñidas con el VENTANA HER2 (4B5) Assay con una puntuación HER2 modificada. Un aumento del tiempo de incubación del anticuerpo puede producir una tinción inaceptable en el NRC, que podría impedir la evaluación de la muestra con VENTANA HER2 (4B5) Assay. La reducción o ampliación de los tiempos de acondicionamiento celular suelen producir muestras con tinción del anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuaciones de HER2 alteradas, lo que puede dar lugar a la toma de decisiones poco acertadas en el tratamiento de los pacientes. El aumento de los tiempos de incubación de hematoxilina es probable que produzca muestras con tinción del VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuaciones de HER2 modificadas en muestras de BTC, lo que puede dar lugar a la toma de decisiones poco acertadas en el tratamiento de los pacientes.
2. 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. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».¹³
3. Los portaobjetos deberían teñirse inmediatamente, dado que la antigenicidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo y es posible que se dañen debido a los factores ambientales si se almacenan durante un periodo prolongado. Los portaobjetos que se hayan dejado secar al aire se deberían desecar y conservar a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Los estudios han demostrado que los portaobjetos sin tinción mantienen la estabilidad del antígeno durante 45 días. Dado que se ha confirmado que los factores medioambientales influyen en la estabilidad de los antígenos en los portaobjetos con cortes, los laboratorios deben validar la estabilidad de los cortes en los portaobjetos en su propio entorno.
4. No se ha sometido a pruebas la especificidad de la médula ósea. El usuario debe establecer la tinción que considera adecuada en los tejido mencionados anteriormente antes de la interpretación de la información sobre la tinción.
5. 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 de unión

gastroesofágica y del BTC. La naturaleza de esta tinción nuclear y tinción citoplasmática se desconoce actualmente. El patrón de tinción no debe confundirse con una tinción membranosa discontinua que indica la positividad en HER2 en células neoplásicas.

6. Es posible que no todos los ensayos estén registrados en todos los instrumentos. Póngase en contacto con el representante local de servicio Roche para obtener más información.
7. Se ha notificado la presencia de cambios en el estado de HER2 en cáncer de mama con la progresión metastásica o tras el tratamiento neoadyuvante con quimioterapia. En función de estas observaciones, puede estar justificado obtener una nueva muestra para determinar el estado de HER2 en el momento en el que se vaya a poner el tratamiento, en lugar de basarse en el estado histórico de HER2.²¹

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se realizaron pruebas de tinción para evaluar la sensibilidad, especificidad y precisión y los resultados se indican en la Tabla 10 y la Tabla 11..

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y especificidad de VENTANA HER2 (4B5) Assay se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos normales. Los resultados de tinción se muestran en la Tabla 10. La sensibilidad y especificidad de VENTANA HER2 (4B5) Assay también se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos neoplásicos. Los resultados de tinción se muestran en la Tabla 11. La tinción para comprobar la sensibilidad y la especificidad se llevó a cabo con el protocolo *iVIEW DAB* Detection Kit en un instrumento BenchMark XT o con el protocolo *ultraView* Universal DAB Detection Kit en el caso del instrumento BenchMark ULTRA.

La tinción positiva en el epitelio tonsilar, epitelio esofágico, próstata, vejiga, nervio periférico, paratiroideo, cáncer de mama, adenocarcinoma de estómago, colon y cáncer ovárico coincide con la documentación publicada sobre la expresión de HER2.

Tabla 10. La sensibilidad/especificidad de VENTANA HER2 (4B5) Assay 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 ^b	3/3
Tiroides	0/6	Recto	0/6
Mama	0/14	Glándula paratiroidea ^c	4/6
Bazo	0/6	Endometrio	0/3
Amígdala ^a	3/6	Útero	0/3
Timo	0/5	Cuello del útero	0/5
Médula ósea	0/3	Endocérvix	0/1
Pulmón	0/6	Músculo esquelético	0/6
Corazón	0/5	Piel	0/6
Pericardio	0/3	Nervio	2/6

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Esófago	1/6	Mesotelio	0/3
Estómago	0/11		

- ^a Tinción focal de la superficie de las células epiteliales
- ^b Tinción membranosa de las células superficiales en paraguas
- ^c Tinción focal de membrana

Tabla 11. La sensibilidad/especificidad de VENTANA HER2 (4B5) Assay 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
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma, sin especificar (tiroides)	0/3
Carcinoma ductal microinvasivo (mama)	2/2
Carcinoma ductal invasivo (mama)	44/98
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

Patología	N.º de casos positivos/total
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
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
Leiomioma (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomioma (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
Adenocarcinoma (vesícula biliar)	33/100
Colangiocarcinoma (intrahepático y extrahepático)	19/100

Rendimiento de análisis en casos de mama con HER2 ultrabaja

Repetibilidad y precisión intermedia de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA

Para evaluar la precisión de VENTANA HER2 (4B5) Assay en el instrumento BenchMark ULTRA en casos de HER2 ultrabaja, se llevaron a cabo tres estudios de precisión: Estudio de precisión intermedia, estudio de precisión del lector (anatomopatólogo) y estudio de precisión (reproducibilidad) entre laboratorios y entre lectores.

Precisión intermedia de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA

En el estudio de precisión intermedia se incluyeron veinticuatro casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de HER2 IHC. El diseño del estudio para la evaluación de la precisión de la tinción de tejidos de carcinoma de mama teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay incluía:

- Tres lotes de anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) (entre lotes de anticuerpo)
- Tres lotes de *ultraView* Universal DAB Detection Kit (entre lotes de kits de detección)
- En tres días diferentes (entre días)
- Tres instrumentos BenchMark ULTRA (entre instrumentos)
- En todas las condiciones de precisión intermedia (en una misma sesión)

Se asignó un modo a cada caso en función de las muestras consolidadas por condiciones de la prueba: entre lotes de anticuerpo, entre lotes de kits de detección, entre instrumentos y entre días. En el caso de la condición en una misma sesión, cada caso se comparó con sus muestras duplicadas en cada sesión de prueba. Se enmascararon y aleatorizaron todos los portaobjetos y, a continuación, se evaluaron siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con la tinción VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tabla 6). Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Repetibilidad y precisión intermedia del VENTANA HER2 (4B5) Assay en tejidos de cáncer de mama con una puntuación de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Repetibilidad/ Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lotes de anticuerpo	PPA	67/67	100.0	(94.6, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	139/139	100.0	(97.3, 100.0)
Entre kits de detección	PPA	67/67	100.0	(94.6, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	139/139	100.0	(97.3, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	67/67	100.0	(94.6, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	139/139	100.0	(97.3, 100.0)
Entre días	PPA	68/68	100.0	(94.7, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	140/140	100.0	(97.3, 100.0)
En la misma sesión	PPA	99/99	100.0	(96.3, 100.0)
	NPA	108/108	100.0	(96.6, 100.0)
	OPA	207/207	100.0	(98.2, 100.0)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap. Los CI del 100 % de los PPA, NPA y OPA se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana e IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 baja y HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Precisión del lector de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA

Se evaluaron la precisión del lector y entre lectores mediante la evaluación de la concordancia del estado de nivel de HER2 baja entre tres lectores y con tres lectores de forma individual. En el estudio se incluyeron 100 casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de IHC de HER2. Se enmascararon y aleatorizaron las muestras antes de su evaluación para determinar el estado de HER2 según el patrón de tinción de membrana celular con la tinción con VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tabla 6). Los lectores puntuaron todas las muestras dos veces, con un mínimo de dos semanas entre lecturas. La concordancia de la precisión entre lectores y del lector se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Precisión del lector y entre lectores de VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuaciones de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Mismo lector	APA	302/309	97.7	(95.9, 99.3)
	ANA	284/291	97.6	(95.6, 99.3)
	OPA	293/300	97.7	(95.7, 99.3)

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lectores	APA	296/310	95.5	(91.7, 98.4)
	ANA	276/290	95.2	(91.1, 98.2)
	OPA	286/300	95.3	(92.0, 98.0)

Nota: Promedio de concordancia positiva (APA), promedio de concordancia negativa (ANA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana e IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 baja y HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Tanto la precisión entre lectores como la precisión de lectores mostraron porcentajes altos de concordancia. Para comprender la precisión en el %TC y el rango de intensidad de la tinción, se resumen en la Tabla 14 las estadísticas descriptiva por categoría de caso y en la Tabla 15 se ofrecen los componentes de precisión y los resultados del porcentaje «idóneos» para casos del estudio de precisión del lector para HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Tabla 14. Resultados de precisión del lector de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Categoría de caso	HER2 IHC	N.º de casos	N.º de lecturas	Resultados por HER2 IHC, categoría de %TC				
				IHC 0, Sin tinción	IHC > 0 < 1+, Difusión incompleta ≤ 10 %	IHC 1+, Difusión incompleta > 10 %	IHC 2+, Completa de débil a moderada	IHC 3+, intensa completa
Sin tinción	0	32	192	192	0	0	0	0
Sin tinción/difusión incompleta ≤ 10 %	0/> 0 < 1+	3	18	9	9	0	0	0
Difusión incompleta ≤ 10 %	> 0 < 1+	9	54	0	54	0	0	0
Difusión incompleta ≤ 10 %/> 10 %	> 0 < 1+/1+	3	18	0	15	3	0	0
Difusión incompleta ≤ 10 %/> 10 %	> 0 < 1+/1+	4	24	0	12	12	0	0
Difusión incompleta > 10 %	1+	11	66	0	0	66	0	0
Difusión incompleta > 10 %/completa de débil a moderada	1+/2+	4	24	0	0	18	6	0
Difusión incompleta > 10 %/completa de débil a moderada	1+/2+	3	18	0	0	5	13	0
Completa de débil a moderada	2+	14	84	0	0	0	84	0
Completa de débil a moderada/intensa completa	2+/3+	5	30	0	0	0	12	18
Muy variable	0/3+	1	6	1	0	0	0	5
Intensa completa	3+	11	66	0	0	0	0	66

Tabla 15. Componentes de precisión en los casos del estudio de precisión del lector de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Categoría de caso	HER2 IHC	N.º de casos	Rango de mediana de % de TC	DE			Porcentaje de resultados «idóneos»
				Mismo lector	Entre lectores	Total	
Sin tinción	0	32	0.0-0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 % (0/192)
Sin tinción/difusión incompleta ≤ 10 %	0/> 0 < 1+	3	0.0-1.0	0.5	0.4	0.5	50.0 % (9/18)
Difusión incompleta ≤ 10 %	> 0 < 1+	9	2.0-9.5	1.4	1.4	1.4	100.0 % (54/54)
Difusión incompleta ≤ 10 %/> 10 %	> 0 < 1+/1+	3	5.0-10.0	2.9	0.0	2.9	100.0 % (18/18)
Difusión incompleta ≤ 10 %/> 10 %	> 0 < 1+/1+	4	8.0-12.5	6.0	3.9	6.0	100.0 % (24/24)
Difusión incompleta > 10 %	1+	11	15.0-55.0	14.9	5.1	14.9	100.0 % (66/66)
Difusión incompleta > 10 %/completa de débil a moderada	1+/2+	4	N/A	N/A	N/A	N/A	100.0 % (24/24)
Difusión incompleta > 10 %/completa de débil a moderada	1+/2+	3	N/A	N/A	N/A	N/A	100.0 % (18/18)
Completa de débil a moderada	2+	14	15.0-77.5	13.7	16.6	13.7	100.0 % (84/84)
Completa de débil a moderada/intensa completa	2+/3+	5	N/A	N/A	N/A	N/A	40.0 % (12/30)
Muy variable	0/3+	1	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0 % (0/6)
Intensa completa	3+	11	30.0-100.0	8.2	16.3	8.2	0.0 % (0/66)

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para demostrar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de HER2 ultrabaja en los casos de carcinoma de mama. El estudio incluía 28 muestras de tejido de carcinoma de mama FFPE archivadas que se tomaron en tres instrumentos BenchMark ULTRA en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Cada uno de los cinco conjuntos de portaobjetos que se tiñeron por muestra y por día de tinción se aleatorizaron y se evaluaron posteriormente por parte de seis lectores (dos lectores por sitio) para establecer su estado de nivel de HER2 ultrabaja. Los resultados del estado de HER2 ultrabaja de todos los lectores, los sitios y los días de las muestras se combinaron y analizaron en comparación con los modos de lector de los mismos casos para determinar la reproducibilidad global del estado de HER2 ultrabaja. El resumen de los índices de concordancia en todas las observaciones evaluables usando los modos del lector de nivel de muestra para el estado de HER2 como referencia pueden consultarse en la Tabla 16 y la Tabla 17.

Tabla 16. Reproducibilidad entre laboratorios de todos los índices de concordancia global de VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuación de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Global	PPA	413/420	98.3	(96.7, 99.8)
	NPA	420/420	100.0	(99.1, 100.0)
	OPA	833/840	99.2	(98.3, 99.9)
En el mismo sitio	PPA	413/420	98.3	(96.8, 99.1)
	NPA	420/420	100.0	(99.1, 100.0)
	OPA	833/840	99.2	(97.7, 99.4)

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Mismo lector	PPA	413/420	98.3	(96.7, 99.8)
	NPA	420/420	100.0	(99.1, 100.0)
	OPA	833/840	99.2	(98.3, 99.9)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon utilizando el método bootstrap percentil con 2000 replicados.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana e IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 baja y HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Tabla 17. Índices de concordancia entre pares de la reproducibilidad entre laboratorios de VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuación de HER2 ultrabaja en el instrumento BenchMark ULTRA.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	8124/8260	98.4	(96.7, 99.8)
	ANA	8404/8540	98.4	(96.9, 99.8)
	OPA	8264/8400	98.4	(96.8, 99.8)

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lectores	APA	406/413	98.3	(96.6, 99.8)
	ANA	420/427	98.4	(96.8, 99.8)
	OPA	413/420	98.3	(96.7, 99.8)
Entre días	APA	1628/1652	98.5	(97.2, 99.8)
	ANA	1684/1708	98.6	(97.4, 99.8)
	OPA	1656/1680	98.6	(97.3, 99.8)

Nota: Promedio de concordancia positiva (APA), promedio de concordancia negativa (ANA) y porcentaje de concordancia global (OPA)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon utilizando el método bootstrap percentil con 2000 replicados

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana e IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 baja y HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Estudio comparativo del instrumento BenchMark ULTRA con el instrumento BenchMark XT y el instrumento BenchMark GX para HER2 ultrabaja

En el estudio de precisión intermedia se incluyeron diez casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de IHC de HER2. El diseño del estudio verificaba la precisión de la tinción de tejidos de carcinoma de mama teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay en varios instrumentos y diferentes plataformas.

Cada muestra se asignó a un modo en función de las muestras consolidadas por condiciones de la prueba. Cada muestra se comparó con sus muestras duplicadas en cada sesión de prueba. Se enmascararon ya aleatorizaron todos los portaobjetos y, a continuación, se evaluaron siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con la tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay (Tabla 6). Los resultados se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Repetibilidad y precisión intermedia del VENTANA HER2 (4B5) Assay en tejidos de cáncer de mama con una puntuación de HER2 ultrabaja

Repetibilidad/ Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre plataformas (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Repetibilidad/ Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre instrumentos (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap. Los CI del 100 % de los PPA, NPA y OPA se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS para HER2 ultrabaja

Tres laboratorios participaron en un estudio de concordancia para evaluar la equivalencia de rendimiento entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. Para el análisis de la línea de corte de HER2 ultrabaja, se seleccionaron previamente 160 de los casos (80 positivos y 80 negativos, incluidos 16 casos límite) para el análisis antes de las lecturas de los anatomopatólogos. Los portaobjetos de tejido de todos los casos se teñieron con un control de reactivo negativo y con VENTANA HER2 (4B5) Assay en un laboratorio interno de Roche en un instrumento BenchMark ULTRA y utilizando el protocolo de tinción recomendado. Los portaobjetos con tejido sin tinción de todos los casos se aleatorizaron y se distribuyeron de forma equitativa para su tinción en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con el protocolo de tinción recomendado de VENTANA HER2 (4B5). Con el estado de casos enmascarados, lectura de un lector por sitio y los portaobjetos teñidos con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS de su sitio, se determinó el estado de HER2 (4B5). Los resultados se analizaron en Roche. Los resultados se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Concordancia combinada del estado de HER2 ultrabaja de los casos teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay en el instrumento BenchMark ULTRA frente a BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Total
	Lector de Roche = positiva, Lector externo = positiva	Lector de Roche = positiva, Lector externo = negativa	Lector de Roche = negativa, Lector externo = positiva	Lector de Roche = negativa, Lector externo = negativa	
Positiva	290	8	12	4	314
Negativa	15	21	5	283	324
Total	305	29	17	287	638
Porcentaje de positiva % (n/N)	95.1 (290/305)	27.6 (8/29)	70.6 (12/17)	1.4 (4/287)	N/A
	n/N			% (CI del 95 %)	

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Total
	Lector de Roche = positiva, Lector externo = positiva	Lector de Roche = positiva, Lector externo = negativa	Lector de Roche = negativa, Lector externo = positiva	Lector de Roche = negativa, Lector externo = negativa	
PPA	298/334			89.2 (84.7, 93.8)	
NPA	288/304			94.7 (90.7, 98.4)	
OPA	586/638			91.8 (88.4, 95.1)	

Nota: PPA = Porcentaje de concordancia positiva; NPA = Porcentaje de concordancia negativa; OPA = Porcentaje de concordancia global.

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación mediante IHC.

Nota: La concordancia combinada incluyó todos los casos y todos los lectores ULTRA PLUS.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios: instrumento BenchMark ULTRA PLUS para HER2 ultrabaja

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para demostrar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de bajo nivel de HER2 en los casos de carcinoma de mama. Este estudio incluía 28 muestras de tejido de carcinoma de mama FFPE archivadas y no identificadas que se tomaron en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Cada uno de los cinco conjuntos de portaobjetos que se hicieron por muestra y por día de tinción se aleatorizaron y se evaluaron posteriormente por parte de seis lectores (dos lectores por sitio) para establecer su estado de nivel de HER2 ultrabaja. Los resultados del estado de HER2 ultrabaja de todos los lectores, los sitios y los días de las muestras se combinaron y se analizaron en comparación con los modos de lector de los mismos casos para determinar la reproducibilidad global del estado de HER2 baja. El resumen de los índices de concordancia en todas las observaciones evaluables usando los modos del lector de nivel de muestra para HER2 ultrabaja como referencia puede consultarse en la Tabla 20.

Tabla 20. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia global para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con puntuación de HER2 ultrabaja.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Análisis primario/global	PPA	409/420	97.4	(95.5, 99.0)
	NPA	409/420	97.4	(94.8, 99.3)
	OPA	818/840	97.4	(95.8, 98.7)
Estratificado por sitio	PPA	409/420	97.4	(95.5, 99.0)
	NPA	409/420	97.4	(94.8, 99.3)
	OPA	818/840	97.4	(95.8, 98.7)

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Estratificado por lector	PPA	412/425	96.9	(95.0, 98.6)
	NPA	407/415	98.1	(96.5, 99.3)
	OPA	819/840	97.5	(96.1, 98.7)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Además, se llevaron a cabo comparaciones entre pares del estado de HER2 (4B5) entre sitios, entre lectores y entre días. Tal y como se recoge en la Tabla 21, los datos indican una reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 sitios y 6 lectores.

Tabla 21. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia entre pares para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con puntuación de HER2 ultrabaja

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	7986/8400	95.1	(92.4, 97.4)
	ANA	7986/8400	95.1	(92.1, 97.4)
	OPA	7986/8400	95.1	(92.2, 97.4)
Entre lectores	APA	398/420	94.8	(91.7, 97.4)
	ANA	398/420	94.8	(91.4, 97.4)
	OPA	398/420	94.8	(91.7, 97.4)
Entre días	APA	1610/1680	95.8	(93.6, 97.8)
	ANA	1610/1680	95.8	(93.5, 97.8)
	OPA	1610/1680	95.8	(93.6, 97.7)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 sin tinción de membrana y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con niveles de HER2 ultrabaja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 0 con tinción de membrana, de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Rendimiento de análisis en cáncer de mama con nivel bajo de HER2 Repetibilidad y precisión intermedia de HER2 baja en el instrumento BenchMark ULTRA

En el estudio de repetibilidad y precisión intermedia se incluyeron veinticuatro casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de IHC de HER2. El diseño del estudio verificaba la precisión de la tinción de tejidos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay.

- Tres lotes de anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) (entre lotes de anticuerpo)
- Tres lotes de *ultraView* Universal DAB Detection Kit (entre lotes de kits de detección)
- En tres días diferentes (entre días)
- Tres instrumentos BenchMark ULTRA (entre instrumentos)
- En todas las condiciones de precisión intermedia (en una misma sesión)

Se asignó un modo a cada caso en función de las muestras consolidadas por condiciones de la prueba: entre lotes de anticuerpo, entre lotes de kits de detección, entre instrumentos y entre días. En el caso de la condición en una misma sesión, cada caso se comparó con sus muestras duplicadas en cada sesión de prueba. Antes de la evaluación, se enmascararon y se aleatorizaron las muestras. Las muestras se evaluaron con los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular para el algoritmo de puntuación para IHC 0, IHC 1+, IHC 2+ e IHC 3+. Nota: La categoría de HER2 ultrabaja, que subdividía la categoría de IHC 0 previa en IHC 0 sin tinción de membrana e IHC 0 con tinción de membrana, no formaba parte del algoritmo de puntuación en el momento en que se realizó este análisis. Véase la sección (enlace a la sección ultrabaja) para el análisis que utilizó el algoritmo de puntuación en la Tabla 5, incluida la categoría HER2 ultrabaja. Los resultados se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Repetibilidad y precisión intermedia del anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay en tejidos de cáncer de mama con una baja puntuación de HER2

Repetibilidad/ Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lotes de anticuerpo	PPA	96/96	100.0	(96.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	144/144	100.0	(97.4, 100.0)
Entre kits de detección	PPA	93/96	96.9	(92.2, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	141/144	97.9	(94.4, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	95/96	99.0	(96.7, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	143/144	99.3	(97.9, 100.0)
Entre días	PPA	94/96	97.9	(93.3, 100.0)
	NPA	48/48	100.0	(92.6, 100.0)
	OPA	142/144	98.6	(95.8, 100.0)
En la misma sesión	PPA	142/144	98.6	(96.5, 100.0)
	NPA	72/72	100.0	(94.9, 100.0)
	OPA	214/216	99.1	(97.7, 100.0)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap. Los CI del 100 % de los PPA, NPA y OPA se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Estudio de comparación entre los instrumentos BenchMark ULTRA frente a BenchMark XT y BenchMark GX para HER2 baja

En el estudio de precisión intermedia se incluyeron diez casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de IHC de HER2. El diseño del estudio verificaba la precisión de la tinción de tejidos de carcinoma de mama teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay en varios instrumentos y diferentes plataformas.

Cada muestra se asignó a un modo en función de las muestras consolidadas por condiciones de la prueba. Cada muestra se comparó con sus muestras duplicadas en cada sesión de prueba. Se enmascararon y aleatorizaron las muestras antes de su evaluación para determinar el estado de HER2 bajo según el patrón de tinción de membrana celular con la tinción con VENTANA HER2 (4B5) Assay con el algoritmo de puntuación, incluidas las categorías IHC 0, IHC 1+, IHC 2+ e IHC 3+. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23. Repetibilidad y precisión intermedia del anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay en tejidos de cáncer de mama con una baja puntuación de HER2

Repetibilidad/ Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre plataformas (ULTRA/GX/XT)	PPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	NPA	90/90	100.0	(95.9, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark GX)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark XT)	PPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	NPA	30/30	100.0	(88.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap. Los CI del 100 % de los PPA, NPA y OPA se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Precisión del lector para HER2 baja en el instrumento BenchMark ULTRA

Se evaluaron la precisión del lector y entre lectores mediante la evaluación de la concordancia del estado de nivel bajo de HER2 entre tres lectores y con tres lectores de forma individual. En el estudio se incluyeron 100 casos de carcinoma de mama que reflejaban todo el intervalo de tinción de IHC de HER2. Se enmascararon y aleatorizaron las muestras antes de su evaluación para determinar el estado de HER2 bajo según el patrón de tinción de membrana celular con la tinción con VENTANA HER2 (4B5) Assay con el algoritmo de puntuación, incluidas las categorías IHC 0, IHC 1+, IHC 2+ e IHC 3+. (Tabla 6). Los lectores puntuaron todas las muestras dos veces, con un mínimo de dos semanas entre lecturas. La concordancia de la precisión entre lectores y del lector se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24. Precisión del lector y entre lectores de VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuaciones de HER2 bajo

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Mismo lector	APA	312/333	93.7	(90.9, 96.4)
	ANA	246/267	92.1	(88.0, 95.6)
	OPA	279/300	93.0	(90.0, 96.0)

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lectores	APA	300/332	90.4	(85.8, 94.3)
	ANA	236/268	88.1	(82.1, 93.0)
	OPA	268/300	89.3	(84.7, 94.0)

Nota: Promedio de concordancia positiva (APA), promedio de concordancia negativa (ANA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap.

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios para HER2 baja en el instrumento BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para demostrar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de bajo nivel de HER2 en los casos de carcinoma de mama. El estudio incluía 28 muestras de tejido de carcinoma de mama FFPE archivadas y no identificadas que se tomaron en tres instrumentos BenchMark ULTRA en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Cada uno de los cinco conjuntos de portaobjetos que se tiñeron por muestra y por día de tinción se aleatorizaron y se evaluaron posteriormente por parte de seis lectores (dos lectores por sitio) para establecer su estado de nivel bajo de HER2. Los resultados del estado de bajo nivel de HER2 de todos los lectores, los sitios y los días de las muestras se combinaron y se analizaron en comparación con los modos de lector de los mismos casos para determinar la reproducibilidad global del estado de nivel bajo de HER2. El resumen de los índices de concordancia en todas las observaciones evaluables usando los modos del lector de nivel de muestra para HER2 baja como referencia puede consultarse en la Tabla 25.

Tabla 25. Reproducibilidad entre laboratorios de todos los índices de concordancia global de VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuación de HER2 baja

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Global	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
En el mismo sitio	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)
Mismo lector	PPA	407/416	97.8	(96.2, 99.3)
	NPA	416/418	99.5	(98.8, 100.0)
	OPA	823/834	98.7	(97.7, 99.4)

Nota: Porcentaje de concordancia positiva (PPA), porcentaje de concordancia negativa (NPA) y porcentaje de concordancia global (OPA).

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon utilizando el método bootstrap percentil con 2000 replicados.

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Además, se llevaron a cabo comparaciones entre sitios, lectores y días para HER2 bajo. En la Tabla 26 se resumen los resultados. Los datos indican una reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 sitios y 6 lectores.

Tabla 26. Reproducibilidad entre laboratorios de todos los porcentajes de concordancia global del anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Assay con puntuación de bajo nivel de HER2

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	7884/8102	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	8240/8458	97.4	(95.7, 98.8)
	OPA	8062/8280	97.4	(95.5, 98.8)
Entre lectores	APA	398/409	97.3	(95.4, 98.8)
	ANA	414/425	97.4	(95.6, 98.8)
	OPA	406/417	97.4	(95.5, 98.8)
Entre días	APA	1580/1620	97.5	(95.9, 98.9)
	ANA	1652/1692	97.6	(96.2, 98.9)
	OPA	1616/1656	97.6	(96.1, 98.9)

Nota: Promedio de concordancia positiva (APA), promedio de concordancia negativa (ANA) y porcentaje de concordancia global (OPA)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon utilizando el método bootstrap percentil con 2000 replicados

Nota: A efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que según el diseño del ensayo clínico no eran idóneos para el tratamiento de HER2 baja, y las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos dado que eran idóneos o potencialmente idóneos para el tratamiento de HER2 baja según el diseño del ensayo.

Concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS para HER2 bajo

Tres laboratorios participaron en un estudio de concordancia para evaluar la equivalencia de rendimiento entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. Para el análisis estadístico de HER2 bajo, se seleccionaron previamente 160 de los casos (80 positivos y 80 negativos, incluidos 16 casos límite) para el análisis antes de las lecturas de los anatomopatólogos. Los portaobjetos de tejido de todos los casos se tiñeron con un control de reactivo negativo y con VENTANA HER2 (4B5) Assay en un laboratorio interno de Roche en un instrumento BenchMark ULTRA y utilizando el protocolo de tinción recomendado. Los portaobjetos con tejido sin tinción de todos los casos se aleatorizaron y se distribuyeron de forma equitativa para su tinción en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con el protocolo de tinción recomendado de VENTANA HER2 (4B5). Con el estado de casos enmascarados, lectura de un lector por sitio y los portaobjetos teñidos con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS de su sitio, se determinó el estado de HER2 (4B5). Los resultados se analizaron en Roche. Los resultados se resumen en la Tabla 27.

Tabla 27. Concordancia combinada del estado de HER2 bajo de los casos teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Total
	Lector de Roche = positiva, Lector externo = positiva	Lector de Roche = positiva, Lector externo = negativa	Lector de Roche = negativa, Lector externo = positiva	Lector de Roche = negativa, Lector externo = negativa	
Positiva	272	13	25	11	321
Negativa	8	9	2	298	317
Total	280	22	27	309	638

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Total
	Lector de Roche = positiva, Lector externo = positiva	Lector de Roche = positiva, Lector externo = negativa	Lector de Roche = negativa, Lector externo = positiva	Lector de Roche = negativa, Lector externo = negativa	
Porcentaje de positiva % (n/N)	97.1 (272/280)	59.1 (13/22)	92.6 (25/27)	3.6 (11/309)	N/A
	n/N		% (CI del 95 %)		
PPA	285/302		94.4 (91.6, 96.8)		
NPA	300/336		89.3 (84.3, 94.4)		
OPA	585/638		91.7 (88.5, 94.6)		

Nota: PPA = Porcentaje de concordancia positiva; NPA = Porcentaje de concordancia negativa; OPA = Porcentaje de concordancia global.

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación mediante IHC.

Nota: La concordancia combinada incluyó todos los casos y los lectores ULTRA PLUS.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con nivel de HER2 baja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios: instrumento BenchMark ULTRA PLUS para HER2 baja

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para demostrar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de bajo nivel de HER2 en los casos de carcinoma de mama. Este estudio incluía 28 muestras de tejido de carcinoma de mama FFPE archivadas y no identificadas que se tomaron en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Cada uno de los cinco conjuntos de portaobjetos que se tiñeron por muestra y por día de tinción se aleatorizaron y se evaluaron posteriormente por parte de seis lectores (dos lectores por sitio) para establecer su estado de nivel bajo de HER2. Los resultados del estado de bajo nivel de HER2 de todos los lectores, los sitios y los días de las muestras se combinaron y se analizaron en comparación con los modos de lector de los mismos casos para determinar la reproducibilidad global del estado de nivel bajo de HER2. El resumen de los índices de concordancia en todas las observaciones evaluables usando los modos del lector de nivel de muestra para HER2 baja como referencia puede consultarse en la Tabla 28.

Tabla 28. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia global para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con puntuación de HER2 baja.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Análisis primario/global	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)
Estratificado por sitio	PPA	407/420	96.9	(93.6, 99.3)
	NPA	405/420	96.4	(92.2, 100.0)
	OPA	812/840	96.7	(94.0, 98.9)

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Estratificado por lector	PPA	412/425	96.9	(94.8, 98.7)
	NPA	405/415	97.6	(94.9, 100.0)
	OPA	817/840	97.3	(95.2, 98.9)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con nivel de HER2 baja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Además, se llevaron a cabo comparaciones entre pares del estado de HER2 (4B5) entre sitios, entre lectores y entre días. Tal y como se recoge en la Tabla 29, los datos indican una reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 sitios y 6 lectores.

Tabla 29. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia entre pares para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con puntuación de HER2 baja.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	7982/8440	94.6	(90.3, 97.9)
	ANA	7902/8360	94.5	(90.6, 98.0)
	OPA	7942/8400	94.5	(90.5, 98.0)
Entre lectores	APA	402/422	95.3	(91.7, 98.1)
	ANA	398/418	95.2	(91.8, 98.1)
	OPA	400/420	95.2	(91.9, 98.1)
Entre días	APA	1608/1688	95.3	(91.5, 98.2)
	ANA	1592/1672	95.2	(91.8, 98.2)
	OPA	1600/1680	95.2	(91.8, 98.2)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos.

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 de IHC 0 y de IHC 3+ se agruparon como casos negativos dado que ninguno de esos casos cumplía con los criterios de idoneidad del ensayo clínico que investigaba el cáncer de mama con nivel de HER2 baja. Las puntuaciones de HER2 de IHC 1+ y de IHC 2+ se agruparon como casos positivos porque cumplían con los criterios de idoneidad o eran potencialmente elegibles para el ensayo clínico.

Rendimiento de análisis en casos de mama con HER2 positiva Concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS para HER2 positivo

Tres laboratorios participaron en un estudio de concordancia para evaluar la equivalencia de rendimiento entre el instrumento BenchMark ULTRA PLUS y el instrumento BenchMark ULTRA. En los análisis de HER2 positiva, la puntuación HER2 IHC de IHC 2+ o IHC 3+ se define como HER2 positiva y una puntuación de IHC 0 o de IHC 1+ se define como HER2 negativa. Para el análisis estadístico de HER2 positivo, se seleccionaron previamente 160 de los casos (80 positivos y 80 negativos, incluidos 16 casos límite) para el análisis antes de las lecturas de los anatomopatólogos. Los portaobjetos de tejido de

todos los casos se tiñeron con un control de reactivo negativo y con VENTANA HER2 (4B5) Assay en un laboratorio interno de Roche en un instrumento BenchMark ULTRA y utilizando el protocolo de tinción recomendado. Los portaobjetos con tejido sin tinción de todos los casos se aleatorizaron y se distribuyeron de forma equitativa para su tinción en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con el protocolo de tinción recomendado de VENTANA HER2 (4B5). Con el estado de casos enmascarados, lectura de un lector por sitio y los portaobjetos teñidos con el instrumento BenchMark ULTRA PLUS de su sitio, se determinó el estado de HER2 (4B5). Los resultados se analizaron en Roche. Los resultados se resumen en la Tabla 30.

Tabla 30. Concordancia combinada del estado de HER2 positiva de los casos teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay en el instrumento BenchMark ULTRA frente a BenchMark ULTRA PLUS.

BenchMark ULTRA PLUS	BenchMark ULTRA				Total
	Lector de Roche = positiva, Lector externo = positiva	Lector de Roche = positiva, Lector externo = negativa	Lector de Roche = negativa, Lector externo = positiva	Lector de Roche = negativa, Lector externo = negativa	
Positiva	245	18	11	13	287
Negativa	6	13	5	327	351
Total	251	31	16	340	638
Porcentaje de positiva % (n/N)	97.6 (245/251)	58.1 (18/31)	68.8 (11/16)	3.8 (13/340)	N/A
	n/N		% (CI del 95 %)		
PPA	(263/282)		93.3 (89.3, 96.6)		
NPA	(332/356)		93.3 (89.7, 96.5)		
OPA	(595/638)		93.3 (90.8, 95.6)		

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación mediante IHC (IHC 0, IHC 1+, IHC 2+, IHC 3+).

Nota: La concordancia combinada incluyó todos los casos y los lectores ULTRA PLUS.

Nota: PPA = Porcentaje de concordancia positiva; NPA = Porcentaje de concordancia negativa; OPA = Porcentaje de concordancia global.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios: instrumento BenchMark ULTRA PLUS para HER2 positiva

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para demostrar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de positividad de HER2 en los casos de carcinoma de mama. Este estudio incluía 28 muestras de tejido de carcinoma de mama FFPE archivadas y no identificadas que se tomaron en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay.

Cada uno de los cinco conjuntos de portaobjetos que se tiñeron por muestra y por día de tinción se aleatorizaron y se evaluaron posteriormente por parte de seis lectores (dos lectores por sitio) para establecer su estado de HER2 positiva. Los resultados del estado de HER2 positivo de todos los lectores, los sitios y los días de las muestras se combinaron y analizaron en comparación con los modos de lector de los mismos casos para determinar la reproducibilidad global del estado de HER2 positivo. El resumen de los índices de concordancia en todas las observaciones evaluables usando los modos del lector de nivel de muestra para HER2 positiva como referencia puede consultarse en la Tabla 31.

Tabla 31. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia global para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con puntuación de HER2 positiva.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Análisis primario/global	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Estratificado por sitio	PPA	411/420	97.9	(95.7, 99.5)
	NPA	410/420	97.6	(94.3, 100.0)
	OPA	821/840	97.7	(96.0, 99.3)
Estratificado por lector	PPA	413/420	98.3	(96.9, 99.5)
	NPA	412/420	98.1	(95.8, 100.0)
	OPA	825/840	98.2	(96.9, 99.4)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de IHC 0 y de IHC 1+ se agruparon como casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de IHC 2+ y IHC 3+ se agruparon como casos positivos.

Además, se llevaron a cabo comparaciones entre pares del estado de HER2 (4B5) entre sitios, entre lectores y entre días. Tal y como se recoge en la Tabla 32, los datos indican una reproducibilidad del ensayo en 5 días, 3 sitios y 6 lectores.

Tabla 32. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia entre pares para VENTANA HER2 (4B5) Assay en carcinoma de mama con tinción positiva de HER2.

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	8074/8420	95.9	(92.8, 98.6)
	ANA	8034/8380	95.9	(92.5, 98.7)
	OPA	8054/8400	95.9	(92.7, 98.6)
Entre lectores	APA	402/421	95.5	(92.0, 98.6)
	ANA	400/419	95.5	(91.6, 98.6)
	OPA	401/420	95.5	(91.9, 98.6)
Entre días	APA	1634/1684	97.0	(95.0, 98.9)
	ANA	1626/1676	97.0	(94.8, 98.9)
	OPA	1630/1680	97.0	(95.0, 98.9)

Nota: Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método bootstrap percentil con 2000 réplicas estratificadas en grupos de puntuación de cualificación de casos

Nota: A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de IHC 0 y de IHC 1+ se agruparon como casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de IHC 2+ y IHC 3+ se agruparon como casos positivos.

Características de rendimiento en el instrumento BenchMark ULTRA con MIEW DAB Detection Kit o ultraView Universal DAB Detection Kit

Tinción entre laboratorios con el instrumento BenchMark ULTRA y reproducibilidad entre días: Tres laboratorios, pertenecientes a instituciones diferentes de EE. UU., participaron en el estudio de reproducibilidad entre laboratorios. Se distribuyeron portaobjetos con secciones de 48 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [12 unidades de cada una

de las puntuaciones de IHC (0, 1+, 2+, 3+) para las categorías de agrupamiento HER2] y un par de PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides en cada una de las 12 sesiones de tinción para estudiar la tinción en los sitios con un instrumento BenchMark ULTRA utilizando 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 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 centros, el APA entre centros, 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.

La Tabla 33, la Tabla 34 y la Tabla 35 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 33. 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
	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	
IHC 3+	12	2	0	14
IHC 2+	0	6	2	8
IHC 0, IHC 1+	0	1	25	26
Total	12	9	27	48
Porcentaje de concordancia global: (OPA): n/N (%)				
(CI del 95 %) 43/48 (89.6) (77.8-95.5)				

Tabla 34. 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
	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	
IHC 3+	12	1	1	14
IHC 2+	0	4	4	8
IHC 0, IHC 1+	0	0	26	26
Total	12	5	31	48
Porcentaje de concordancia global: (OPA): n/N (%)				
(CI del 95 %) 42/48 (87.5) (75.3-94.1)				

Tabla 35. 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
	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	
IHC 3+	12	0	0	12
IHC 2+	0	5	4	9
IHC 0, IHC 1+	0	0	27	27
Total	12	5	31	48

Sitio B	Sitio C			Total
	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	
Porcentaje de concordancia global: (OPA): n/N (%)				
(CI del 95 %) 44/48 (91.7) (80.4-96.7)				

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 IHC (0, 1+, 2+ y 3+) para puntuación clínica. 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 centro C en todos los días, fue en ambos casos del 100 %. Los índices de los porcentajes 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 FFFE [aproximadamente 70 casos de cada una de las puntuaciones IHC (0, 1+, 2+, 3+) para las categorías de agrupamiento HER2] a dos sitios de tinción (140 casos a cada uno) para que se llevara a cabo la tinción en un instrumento BenchMark XT y un instrumento BenchMark ULTRA con los respectivos protocolos de tinción recomendados 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 de IHC en cada caso (es decir, 0, 1+, 2+, 3+) para la puntuación clínica. 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 99.3 (96.3) para el Lector A, B y C, respectivamente. El OPA entre la tinción del clon 4B5 usando el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basados en el análisis 2x2 de la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron del 91.8 %, 92.5 % y 97.4 % en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. En la Tabla 36, la Tabla 37 y la Tabla 38 que aparecen a continuación se muestra la presentación 3x3 de la concordancia entre las plataformas para cada lector, con base en las puntuaciones de IHC (0/1+, 2+, 3+) clínicas:

Tabla 36. 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	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	Total
IHC 3+	84	11	1	96
IHC 2+	8	28	9	45
IHC 0, IHC 1+	4	8	114	126
Total	96	47	124	267
Porcentaje de concordancia global: n/N (%)				
(CI del 95 %) 226/267 (84.6) (79.8-88.5)				

Tabla 37. 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	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	Total
IHC 3+	64	2	1	67
IHC 2+	3	56	7	66
IHC 0, IHC 1+	2	10	122	134
Total	69	68	130	267
Porcentaje de concordancia global: n/N (%) 242/267 (90.6) (86.5-93.6) (CI del 95 %)				

Tabla 38. 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	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	Total
IHC 3+	64	1	0	65
IHC 2+	2	45	1	48
IHC 0, IHC 1+	0	6	148	154
Total	66	52	149	267
Porcentaje de concordancia global: n/N (%) 257/267 (96,3) (93.2-98.0) (CI del 95 %)				

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 NPA para el Lector 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), 80.5 % (124/154), 85.7 % (132/154), 94.4 % (119/126), 98.4 % (124/126), y 98.5 % (132/134), respectivamente. El porcentaje de OPA más elevado se dio entre los lectores A y B (91.8 %) y algo más bajo entre los lectores B y C (91.0 %) y los lectores A y 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 NPA para el Lector 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), 81.9 % (122/149), 85.9 % (128/149), 94.4 % (117/124), 98.4 % (122/124), y 98.5 % (128/130), respectivamente. El porcentaje de OPA más elevado se dio entre los lectores A y B (92.5 %) y algo más bajo entre los lectores B y C (91.4 %) y los lectores A y C (89.1 %).

Estudio de comparación entre iVIEW DAB Detection Kit y ultraView Universal DAB Detection Kit

En el Sitio 1, se utilizó una cohorte de 140 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [aproximadamente 35 casos de cada puntuación de IHC (0, 1+, 2+, 3+) para categoría de agrupamiento HER-2] para llevar a cabo el estudio comparativo entre el iVIEW DAB Detection Kit y ultraView Universal DAB Detection Kit de las tinciones con el clon 4B5 con un instrumento BenchMark ULTRA. Un único laboratorio de tinción y tres centros de lectura de EE. UU. participaron en el estudio de comparación de 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 iVIEW 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 97.1 % (132/136) para los Lectores A, B y C. En la Tabla 39, la Tabla 40 y la Tabla 41 que aparecen a continuación se muestra la presentación 3x3 de la concordancia de comparación de detección para cada lector, con base en las puntuaciones de IHC (0/1+, 2+, 3+) clínicas:

Tabla 39. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre iVIEW DAB Detection Kit frente a ultraView Universal DAB Detection Kit del Lector A: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Lector A	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC1+	Total
IHC 3+	43	5	0	48
IHC 2+	3	17	6	26
IHC 0, IHC 1+	0	3	59	62
Total	46	25	65	136
Porcentaje de concordancia global: n/N (%) 119/136 (87.5) (80.9-92.0) (CI del 95 %)				

Tabla 40. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre iVIEW DAB Detection Kit frente a ultraView Universal DAB Detection Kit del Lector B: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

iVIEW DAB Detection Kit	ultraView Universal DAB Detection Kit			
Lector B	IHC 3+	IHC 2+	IHC 0, IHC 1+	Total
IHC 3+	32	0	0	32
IHC 2+	0	31	6	37
IHC 0, IHC 1+	1	1	65	67
Total	33	32	71	136
Porcentaje de concordancia global: n/N (%) 128/136 (94,1) (88.8-97.0) (CI del 95 %)				

Tabla 41. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre iVIEW DAB Detection Kit frente a ultraView Universal DAB Detection Kit del Lector C: tinción con el clon 4B5 en un instrumento BenchMark ULTRA.

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

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 iVIEW 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 NPA para el Lector 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), 77.2 % (61/79), 82.3 % (65/79), 100.0 % (62/62), 98.4 % (61/62) y 97.0 % (65/67), respectivamente. El porcentaje de concordancia global más elevado se dio entre los lectores A y B (96.3 %) y algo más bajo entre los lectores B y C (86.0 %) y los lectores A y 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 88.7 % (63/71), del 78.9 % (56/71) y del 86.2 % (56/65) respectivamente. Los porcentajes NPA para el Lector 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), 81.0 % (64/79), 88.6 % (70/79), 96.9 % (63/65), 98.5 % (64/65), y 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.

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 IHC 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 IHC de la expresión de HER2 de 0, 1+, 2+ y 3+. Todos los casos 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. En estas sesiones, los 30 portaobjetos de dos bloques diferentes con varios tejidos que contenían tres casos de tejido gástrico con puntuaciones de IHC 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. Para llevar a cabo la prueba, se usaron dos cientos 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 la Tabla 42 y la Tabla 43 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 42. 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
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	21/21	100 (84.5-100)	
Porcentaje de concordancia negativa	189/189	100 (98.0-100)	

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Porcentaje de concordancia global	210/210	100 (98.2-100)	

Tabla 43. 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 (IHC 3+) que negativos (IHC 0, IHC 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 similar en el instrumento BenchMark XT en cada portaobjetos. 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 la Tabla 44, la Tabla 45 y Tabla 46.

Tabla 44. Concordancia global de la evaluación clínica entre sitios: carcinoma gástrico, todos los casos que se podían evaluar.

Instrumento BenchMark ULTRA	Porcentaje de concordancia global (casos positivos y negativos)	Porcentaje de concordancia global (incluidos los casos equivocados)
Sitio A frente a Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)	38/42 (90.5 %) (77.9-96.2)
Sitio A frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)	35/42 (83.3 %) (69.4-91.7)
Sitio B frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	30/30 (100 %) (88.6-100)	31/42 (73.8 %) (58.9-84.7)

Instrumento BenchMark XT	Porcentaje de concordancia global (casos positivos y negativos)	Porcentaje de concordancia global (incluidos los casos equívocos)
Sitio A frente a Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0-91.9)
Sitio A frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)	36/43 (83.7 %) (70.0-91.9)
Sitio B frente a Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	31/31 (100 %) (89.0-100.0)	35/43 (81.4 %) (67.4-90.3)

Tabla 45. 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 (casos positivos y negativos)	Porcentaje de concordancia global (incluidos los casos equívocos)
Sitio A: n/N (%) (CI del 95 %)	40/40 (100 %) (91.2-100)	42/44 (95.5 %) (84.9-98.7)
Sitio B: n/N (%) (CI del 95 %)	34/34 (100 %) (89.8-100)	37/42 (88.1 %) (75.0-94.8)
Sitio C: n/N (%) (CI del 95 %)	32/32 (100 %) (89.3-100)	38/44 (86.4 %) (73.3-93.6)

Tabla 46. Índices de aceptabilidad de la morfología y la tinción de fondo: carcinoma gástrico.

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 del instrumento BenchMark y del instrumento 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 [aproximadamente 50 casos por microarray de tejido] en un instrumento BenchMark XT, un instrumento BenchMark y un instrumento BenchMark GX con los respectivos protocolos de tinción recomendados para *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 TMA 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 al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.0 % (94.2-99.3), instrumento BenchMark GX frente al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97.4 % (93.6-99.0), instrumento BenchMark frente al instrumento 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 al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91.7 % (64.4-98.5), instrumento BenchMark GX frente al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78.6 % (52.4-92.4), instrumento BenchMark frente al instrumento 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 negativos (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 al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98.5 % (94.8-99.6), instrumento BenchMark GX frente al instrumento BenchMark XT con *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99.3 % (96.1-99.9), instrumento BenchMark frente al instrumento 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 la Tabla 47, la Tabla 48, la Tabla 49 y la Tabla 50 se muestran la presentación 2x2 de los índices de concordancia para cada comparación basada en la evaluación clínica (positiva, negativa).

Tabla 47. 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
	n/N	% (CI del 95 %)	
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 48. 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
	n/N	% (CI del 95 %)	
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 49. Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark frente al instrumento BenchMark XT con V/IEW DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con V/IEW DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	12	3	15
Negativa	3	156	159
Total	15	159	174
	n/N	% (CI del 95 %)	
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 50. Análisis 2x2 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark GX frente al instrumento BenchMark XT con V/IEW DAB Detection Kit: carcinoma gástrico.

Clon 4B5 con V/IEW DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark GX	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	11	3	14
Negativa	4	154	158
Total	15	157	172
	n/N	% (CI del 95 %)	
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)	

Rendimiento analítico en casos de cáncer de las vías biliares

Repetibilidad y precisión intermedia de HER2 en BTC en el instrumento BenchMark ULTRA

Se evaluó la precisión intermedia mediante muestras de cáncer de las vías biliares (BTC; es decir, adenocarcinoma de vesícula biliar, colangiocarcinoma intrahepático y colangiocarcinoma extrahepático) complementadas con muestras con carcinomas del sistema digestivo (CDS). En el estudio, se incluyeron veintiocho muestras de CDS (10 de BTC, 10 de adenocarcinoma gastroesofágico [GEA] y 8 de carcinoma colorrectal [CRC]) que reflejaban el intervalo de tinción de HER2 IHC. El diseño del estudio para la evaluación de la precisión de la tinción de tejidos de BTC teñidos con VENTANA HER2 (4B5) Assay incluía:

- Tres lotes de anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) (entre lotes de anticuerpo)
- Tres lotes de *ultraView* Universal DAB Detection Kit (entre lotes de kits de detección)
- Tres instrumentos BenchMark ULTRA (entre instrumentos)
- En cinco días no consecutivos (entre días)
- Dos réplicas en todas las condiciones de precisión intermedia (en una misma sesión)

Se enmascararon y aleatorizaron todos los portaobjetos y, a continuación, se evaluaron siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con la tinción VENTANA HER2 (4B5) Assay en cáncer de las vías biliares. A los efectos del

análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de «0», «1+» y «2+» se agruparon como casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de «3+» se consideraron positivos. Se determinó la precisión con el porcentaje de concordancia positiva (PPA), el porcentaje de concordancia negativa (NPA) y el porcentaje de concordancia global (OPA) en todas las observaciones. En la Tabla 51 se resumen los resultados.

Tabla 51. Repetibilidad y precisión intermedia de VENTANA HER2 (4B5) Assay en tejidos de BTC.

Repetibilidad/Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lotes de anticuerpo	PPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	NPA	126/126	100.0	(97.0, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Entre kits de detección	PPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	NPA	126/126	100.0	(97.0, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	NPA	126/126	100.0	(97.0, 100.0)
	OPA	168/168	100.0	(97.8, 100.0)
Entre días	PPA	70/70	100.0	(94.8, 100.0)
	NPA	210/210	100.0	(98.2, 100.0)
	OPA	280/280	100.0	(98.6, 100.0)
En la misma sesión	PPA	77/77	100.0	(95.2, 100.0)
	NPA	231/231	100.0	(98.4, 100.0)
	OPA	308/308	100.0	(98.8, 100.0)

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 muestras bootstrap. Los CI del 100 % de las estimaciones de puntos se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Precisión intermedia entre instrumentos y entre plataformas con BTC

En el estudio de precisión intermedia se incluyeron diez muestras de CDS (3 BTC, 4 GEA y 3 CRC) que reflejaban el intervalo de tinción de HER2 IHC. El diseño del estudio verificaba la precisión de la tinción de tejidos en muestras teñidas con VENTANA HER2 (4B5) Assay en varios instrumentos y diferentes plataformas.

Cada muestra se asignó a un modo en función de las muestras consolidadas por condiciones de la prueba. Cada muestra se comparó con sus muestras duplicadas en cada sesión de prueba. Se enmascararon ya aleatorizaron todos los portaobjetos y, a continuación, se evaluaron siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con la tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay. A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de 0, 1+ y 2+ se agruparon como casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de 3+ se consideraron positivos. Los resultados se resumen en la Tabla 52.

Tabla 52. Precisión intermedia entre instrumentos y entre plataformas con BTC

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre plataformas (ULTRA/GX/XT)	PPA	54/54	100.0	(93.4, 100.0)
	NPA	126/126	100.0	(97.0, 100.0)
	OPA	180/180	100.0	(97.9, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark ULTRA)	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre instrumentos (BenchMark GX)	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)
Entre plataformas (BenchMark XT)	PPA	18/18	100.0	(82.4, 100.0)
	NPA	42/42	100.0	(91.6, 100.0)
	OPA	60/60	100.0	(94.0, 100.0)

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil. Los CI del 100 % de las estimaciones de puntos se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson.

Precisión del lector y entre lectores para HER2 en BTC en el instrumento BenchMark ULTRA

Se evaluaron los componentes de precisión en el estudio de precisión del lector, entre lectores y del lector. En el estudio se incluyeron 37 muestras de BTC, complementadas con 28 muestras de EGA y 25 de CRC que reflejaban el intervalo de tinción de HER2 IHC. Se enmascararon y aleatorizaron las muestras antes de la evaluación de la puntuación de HER2 siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) Assay en cáncer de las vías biliares. En el estudio participaron 3 lectores (anatomopatólogos). Cada lector puntuó todas las muestras dos veces, con un mínimo de dos semanas entre lecturas. Cada caso se sometió a 6 lecturas (2 lecturas por cada uno de los 3 lectores). La precisión del lector y entre lectores se determinó mediante el promedio de concordancia positiva (APA), el promedio de concordancia negativa (ANA) y el porcentaje de concordancia global (OPA) en todas las observaciones. A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de «0», «1+» y «2+» se agruparon como casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de «3+» se consideraron positivos. En la Tabla 53, se muestra un resumen de los resultados de este estudio.

Tabla 53. Precisión del lector y entre lectores de VENTANA HER2 (4B5) Assay en BTC

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Mismo lector	APA	178/180	98.9	(97.2, 100.0)
	ANA	358/360	99.4	(98.6, 100.0)
	OPA	268/270	99.3	(98.1, 100.0)

Precisión	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre lectores	APA	180/180	100	(97.9, 100.0)
	ANA	360/360	100	(98.9, 100.0)
	OPA	270/270	100	(98.6, 100.0)

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios para VENTANA HER2 (4B5) Assay con BTC en el instrumento BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con VENTANA HER2 (4B5) Assay para evaluar la reproducibilidad del ensayo a la hora de determinar el estado de HER2 de muestras de BTC teñidas en el instrumento BenchMark ULTRA. El estudio incluía 28 muestras de tejido de BTC FFPE no identificadas y teñidas en tres instrumentos BenchMark ULTRA en cada uno de los cinco días no consecutivos durante 20 días en tres laboratorios externos. Las muestras presentaron el intervalo de tinción de VENTANA HER2 (4B5) Assay. Tras la tinción, dos lectores cualificados en cada sitio evaluaron de manera independiente cada portaobjetos de los casos para asignar una puntuación de HER2 IHC siguiendo los criterios de intensidad y patrón de tinción de membrana celular con VENTANA HER2 (4B5) Assay en cáncer de las vías biliares. A los efectos del análisis del estudio, las puntuaciones de HER2 IHC de 0, 1+ y 2+ se consideraron casos negativos y las puntuaciones de HER2 IHC de 3+ se consideraron positivos.

Se analizaron los datos para el porcentaje de concordancia positiva (PPA), el porcentaje de concordancia negativa (NPA) y el porcentaje de concordancia global (OPA) en todas las observaciones disponibles. En cada caso, todas las observaciones disponibles (IHC positiva o IHC negativa) del lector se compararon con el estado modal del caso. Las comparaciones se combinaron en todos los sitios, lectores y días y se presentan en la Tabla 54.

Tabla 54. Reproducibilidad entre laboratorios de todos los índices de concordancia global de VENTANA HER2 (4B5) Assay en BTC en el instrumento BenchMark ULTRA

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Global	PPA	194/210	92.4	(85.2, 97.6)
	NPA	616/628	98.1	(95.2, 100.0)
	OPA	810/838	96.7	(94.0, 99.0)
En el mismo sitio	PPA	194/210	92.4	(85.2, 97.6)
	NPA	616/628	98.1	(95.2, 100.0)
	OPA	810/838	96.7	(94.0, 99.0)
Mismo lector	PPA	200/210	95.2	(89.5, 99.5)
	NPA	622/628	99.0	(97.3, 100.0)
	OPA	822/838	98.1	(96.2, 99.8)

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil de 2000 réplicas.

Además, se llevaron a cabo comparaciones por pares entre sitios, entre lectores y entre días del estado clínico de HER2. Estos datos se analizaron buscando el promedio de

concordancia positiva (APA), el promedio de concordancia negativa (ANA) y el porcentaje de concordancia global (OPA) y se muestran en la Tabla 55.

Tabla 55. Reproducibilidad entre laboratorios de los índices de concordancia entre pares para VENTANA HER2 (4B5) Assay en BTC

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia			
	Tipo	n/N	%	CI del 95 %
Entre sitios	APA	3636/4120	88.3	(79.7, 96.3)
	ANA	12116/12600	96.2	(93.3, 98.8)
	OPA	7876/8360	94.2	(90.0, 98.2)
Entre lectores	APA	182/206	88.3	(78.6, 96.5)
	ANA	608/632	96.2	(92.7, 98.9)
	OPA	395/419	94.3	(89.0, 98.3)
Entre días	APA	772/824	93.7	(87.5, 99.0)
	ANA	2468/2520	97.9	(95.7, 99.7)
	OPA	1620/1672	96.9	(93.7, 99.5)

Nota: El intervalo de confianza (CI) del 95 % bilateral se calculó utilizando el método bootstrap percentil con 2000 réplicas.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Cáncer de mama con HER2 ultrabaja

Estudio de resultados clínicos: DESTINY-Breast06

DESTINY-Breast06 es un estudio en fase III, multicéntrico, aleatorizado, abierto y con control activo que evalúa la seguridad y la eficacia de trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®) en pacientes con cáncer de mama (BC) positivos al receptor hormonal cuya enfermedad haya progresado con el tratamiento endocrino en contexto metastásico con niveles de expresión de HER2 baja o HER2 ultrabaja, confirmados de manera centralizada mediante el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5). Se consideró que un tumor con una puntuación de HER2 IHC de IHC 0 con tinción de membrana (descrita como IHC > 0 < 1+ en este estudio) presentaba un estado de HER2 ultrabaja. Se consideró que un tumor con una puntuación HER2 IHC de IHC 1+ presentaba un estado de HER2 baja. También se consideraba que un tumor era indicativo de niveles de HER2 baja si la puntuación de HER2 IHC era IHC 2+ y la prueba condicionada con ISH indicaba la ausencia de amplificación del gen HER2 (ISH-). Los pacientes inscritos fueron aleatorizados en una proporción 1:1 para recibir el tratamiento con trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®) o con el tratamiento de quimioterapia a elección del facultativo. El estado de HER2 era uno de los tres factores de estratificación que se emplearon para la aleatorización de los pacientes.

La medida principal del resultado de eficacia era la PFS en pacientes con cáncer de mama con HER2 baja evaluado mediante BICR según RECIST v1.1. Las medidas secundarias del resultado de eficacia eran la PFS evaluada mediante BICR según RECIST v1.1 en la población general (HER2 baja y HER2 ultrabaja), la supervivencia global (OS) en pacientes con HER2 baja y la OS en la población general.

Los pacientes aleatorizados con trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®) presentaban una mejora estadísticamente significativa en la PFS tal y como se evalúa mediante BICR en comparación con los pacientes aleatorizados con quimioterapia en las poblaciones de estudio, entre las que se incluye la población con HER2 baja (IHC 1+ o IHC 2+/ISH-) y la población general (HER2 IHC 0 con tinción de membrana, IHC 1+ e IHC 2+/ISH-).

En el subgrupo de HER2 ultrabaja (n = 152), la PFS media fue de 13.2 meses (CI del 95 %: 9.8, 17.3) en pacientes aleatorizados con Enhertu (n = 76) y 8.3 meses (CI del 95 %: 5.8, 15.2) en pacientes aleatorizados con quimioterapia con un índice de riesgo de 0.78 (CI del 95 %: 0.50, 1.21). La OS media fue de 29.5 meses (CI del 95 %: 27.9, NE) en

pacientes aleatorizados con Enhertu y 27.4 meses (CI del 95 %: 19.4, NE) en pacientes aleatorizados con quimioterapia con un índice de riesgo de 0.75 (CI del 95 %: 0.43, 1.29). Los resultados de eficacia del estudio DESTINY-Breast06 se resumen en la Tabla 56.

Tabla 56. PFS según BICR y OS en DESTINY-Breast06

Parámetro	HER2 baja		Población global (HER2 baja y HER2 ultrabaja)	
	Trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®)	Quimioterapia	Trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®)	Quimioterapia
Supervivencia libre de progresión (PFS) según BICR				
N	359	354	436	430
Número de eventos (%)	225 (62.7)	232 (65.5)	269 (61.7)	271 (63.0)
PFS media, meses [CI del 95 %]	13.2 [11.4, 15.2]	8.1 [7.0, 9.0]	13.2 [12.0, 15.2]	8.1 [7.0, 9.0]
Índice de riesgo [CI del 95 %]	0.62 [0.52, 0.75] ^a		0.64 [0.54, 0.76] ^b	
Valor p	< 0.0001 ^a		< 0.0001 ^b	
Supervivencia global (OS)^c				
Número de eventos (%)	136 (37.9)	146 (41.2)	161 (36.9)	174 (40.5)
OS media, meses [CI del 95 %]	28.9 [25.7, 33.7]	27.1 [23.5, 29.9]	28.9 [26.4, 32.7]	27.4 [27.4, 29.9]
Índice de riesgo [CI del 95 %]	0.83 [0.66, 1.05]		0.81 [0.66, 1.01]	

CI = Intervalo de confianza, PFS = Supervivencia libre de progresión, BICR = revisión central, independiente y enmascarada, OS = Supervivencia global

^a Según el análisis estratificado con factores de estratificación anteriores al uso del inhibidor CDK4/6 (sí frente a no) y el estado de HER2 IHC de las muestras del tumor (IHC 1+ frente a IHC 2+/ISH-).

^b Según el análisis sin estratificación.

^c Primer análisis provisional planeado.

Cáncer de mama con nivel bajo de HER2

Estudio de resultados clínicos: DESTINY-BREAST04

DESTINY-BREAST04 es un estudio en fase III, multicéntrico, aleatorizado, abierto y con control activo que se llevó a cabo para evaluar la seguridad y la eficacia de trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®) en pacientes con cáncer de mama inoperable y/o metastásico con bajos niveles de expresión de HER2.

Para poder ser elegibles a la inclusión en el estudio, los tumores tenían que demostrar bajos niveles de la expresión HER2 determinada usando IHC con el anticuerpo anti-HER2 (4B5).

Se consideró que un tumor con una puntuación IHC de HER2 de 1+ para indicar un estado de HER2 bajo. El tumor también se consideraba indicativo de bajos niveles de HER2 si su puntuación de HER2 IHC era de 2+ y la prueba condicionada con el ensayo INFORM HER2 Dual ISH señalaba la ausencia de amplificación del gen HER2 (ISH-). Los pacientes inscritos fueron aleatorizados en una proporción 2:1 para el tratamiento con trastuzumab deruxtecán (ENHERTU®) o con el tratamiento de quimioterapia a elección del facultativo. La puntuación de HER2 baja (IHC 1+ o IHC 2+/ISH-), obtenida de forma centralizada, era uno de los tres factores de estratificación que se emplearon para la aleatorización de los pacientes en el estudio.

Los análisis de eficacia se llevaron a cabo en el conjunto completo de análisis y en la población positiva al receptor hormonal (positivos en receptor de estrógeno y/o receptor de progesterona).

En el análisis primario se analizó la supervivencia libre de progresión (PFS) basada en la evaluación de la revisión central, independiente y enmascarada (BICR) en el subconjunto positivo en el receptor hormonal con estratificación según la puntuación/el estado de nivel bajo de HER2 (IHC 1+ o IHC 2+/ISH-) evaluado de forma centralizada, la cantidad de líneas previas de quimioterapia (1 o 2) y el tratamiento anterior con inhibidores dependientes de la ciclina (CDK)4/6 (sí o no). El tratamiento con trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) se asoció a un aumento estadísticamente significativo y con importancia clínica en el PFS, así como una supervivencia global (OS) en esta población en comparación con el tratamiento de elección del médico. Los resultados de eficacia se resumen en la Tabla 57.

Tabla 57. PFS y OS según BIRC en la población con receptor de hormona positiva y conjunto completo de análisis (DESTINY-BREAST04)

Parámetro	Población positiva en el receptor hormonal		Conjunto completo de análisis	
	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 331	Tratamiento seleccionado por el facultativo N = 163	Trastuzumab deruxtecan (ENHERTU®) N = 373	Tratamiento seleccionado por el facultativo N = 184
Supervivencia libre de progresión (PFS) según BICR				
PFS media ^a (CI del 95 %)	10.1 (9.5, 11.5)	5.4 (4.4, 7.1)	9.9 (9.0, 11.3)	5.1 (4.2, 6.8)
Índice de riesgo ^b (CI del 95 %)	0.51 (0.40, 0.64)		0.50 (0.40, 0.63)	
Valor p ^c	< 0.0001		< 0.0001	
Supervivencia global (OS)				
OS media ^a (CI del 95 %)	23.9 (20.8, 24.8)	17.5 (15.2, 22.4)	23.4 (20.0, 24.8)	16.8 (14.5, 20.0)
Índice de riesgo ^b (CI del 95 %)	0.64 (0.48, 0.86)		0.64 (0.49, 0.84)	
Valor p ^c	0.0028		0.0010	

CI = Intervalo de confianza, PFS = Supervivencia libre de progresión, OS = Supervivencia global

^a Las medias de PFS y OS son estimaciones a partir del análisis Kaplan-Meier. Los CI del 95 % bilaterales de la media de PFS y OS se calcularon con el método Brookmeyer-Crowley.

^b Según el modelo de riesgo proporcional estratificado de Cox. Los factores de estratificación fueron la puntuación de nivel bajo de HER2, la cantidad de líneas previas de quimioterapia y el tratamiento anterior con inhibidores de la quinasa 4/6 dependientes de la ciclina (en el caso del conjunto de análisis completo y de los casos positivos en el receptor hormonal) o bien del estado del receptor hormonal/quinasa dependiente de la ciclina (en el caso del conjunto completo de análisis).

^c Valor p de la prueba del orden logarítmico estratificado.

Cáncer de mama con positividad en HER2

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 correlación 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. Seis investigadores participaron en el estudio. Al estudio se incorporaron dos cohortes independientes de muestras de cáncer de mama invasivo: una con 178 muestras procedentes de Cleveland Clinic Foundation (Cohorte 1) y otra con 144 muestras extraídas por IMPATH Predictive Oncology procedentes de distintos sitios internacionales (Cohorte 2). Dos conjuntos de tres investigadores diferentes evaluaron las 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 FISH se obtuvieron del historial 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.^{22,23,24} Se evaluaron un total de 322 casos. Los portaobjetos teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) se procesaron y tiñeron siguiendo las instrucciones del fabricante especificadas 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). A continuación se exponen los resultados con importancia clínica (positivo/negativo) del ensayo de IHC de HER2 (4B5) y del ensayo de IHC PATHWAY anti-HER2 (CB11) en las dos cohortes en la Tabla 58 y la Tabla 59.

Tabla 58. Puntuaciones con importancia clínica: Ensayos IHC de la Cohorte 1

Anticuerpo HER2 (4B5)	Anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	86	5	91
Negativa	7	80	87
Total	93	85	178
	n/N	Porcentaje (%) (Intervalo de confianza del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	86/93	92.5 (85.2-96.9)	
Porcentaje de concordancia negativa	80/85	94.1 (86.8-98.1)	
Porcentaje de concordancia global	166/178	93.3 (88.5-96.4)	

Nota: Los resultados con importancia clínica se consideraban positivos por IHC (2+ y 3+) y negativos (0+ y 1+)

Tabla 59. Puntuaciones con importancia clínica: Ensayos IHC de la Cohorte 2

Anticuerpo HER2 (4B5)	Anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	69	22	91
Negativa	0	53	53
Total	69	75	144
	n/N	Porcentaje (%) (Intervalo de confianza del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	69/69	100 % (97.5-100 %)	
Porcentaje de concordancia negativa	53/75	70.6 (58.5-80.1)	
Porcentaje de concordancia global	122/144	84.7 (78.2-90.0)	

Nota: Los resultados con importancia clínica se consideraban positivos por IHC (2+ y 3+) y negativos (0+ y 1+)

Los resultados con base en IHC del ensayo IHC de HER2 (4B5) se compararon también con los resultados del ensayo PathVysion HER2 FISH. Los resultados positivos por IHC se corresponden con las puntuaciones de IHC 2+ o 3+ y los resultados positivos por FISH se corresponden con los casos que han presentado la amplificación del gen HER2. A continuación se recogen los datos de concordancia del ensayo de IHC con el clon 4B5 en comparación con los resultados por FISH de las dos cohortes en la Tabla 60 y la Tabla 61.

Tabla 60. Concordancia con importancia clínica: IHC con FISH de la Cohorte 1

Anticuerpo HER2 (4B5)	n/N	Porcentaje (%) (Intervalo de confianza del 95 %)
Porcentaje de concordancia positiva	83/93	89.2 (82.5-95.1)
Porcentaje de concordancia negativa	77/85	90.6 (84.0-96.4)
Porcentaje de concordancia global	160/178	90.0 (85.4-93.6)

Tabla 61. Concordancia con importancia clínica: IHC con FISH de la Cohorte 2

Anticuerpo HER2 (4B5)	n/N	Porcentaje (%) (Intervalo de confianza del 95 %)
Porcentaje de concordancia positiva	80/86	93.0 (87.9-96.3)
Porcentaje de concordancia negativa	47/58	81.0 (73.4-86.0)
Porcentaje de concordancia global	127/144	88.2 (82.1-92.2)

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 ensayo con el anticuerpo VENTANA HER2 (4B5) Rx/Dx es una alternativa aceptable a PATHWAY anti-HER2 (CB11) Assay 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). Este estudio también demuestra que los resultados de la expresión HER2 obtenidos del ensayo IHC del clon 4B5 son comparables a los resultados del estado del gen *HER2* determinados por el análisis FISH.

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

La concordancia con los ensayos de inscripción en las cohortes de los estudios de PERJETA y KADCYLA se determinó mediante la tinción de las muestras del ensayo con VENTANA HER2 (4B5) Assay. Se evaluó un total de 2753 muestras para el ensayo PERJETA y 99 muestras evaluadas para el ensayo KADCYLA se tiñeron con VENTANA HER2 (4B5) Assay. Se determinaron tipos de concordancia (PPA, NPA y OPA). Los CI del 95 % (intervalos de confianza del 95 % bilaterales) se calcularon mediante el método de puntuación. Los porcentajes de concordancia se pueden encontrar en la Tabla 62, la Tabla 63 y la Tabla 64, y la aceptabilidad de la tinción del ensayo en la Tabla 65.

Tabla 62. 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 ^b	Estado Dako HER2 ^{a,b}		
		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]			

Estudio	Puntuación del clon 4B5 ^b	Estado Dako HER2 ^{a,b}		
		Positiva	Negativa	Total
	Porcentaje de concordancia global n/N (%) [CI del 95 %]	2637/2830 (93.2) [92.2-94.1]		

^a Positiva = IHC positiva y/o ISH amplificada. Negativa = IHC negativa e ISH no amplificada o ISH no amplificada y IHC no positiva.

^b IHC: Positiva = 3+; Negativa = 0, 1+ o 2+.

Tabla 63. 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 ^a	Estado Dako HercepTest ^a		
		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]		

^a Positiva = 3+; Negativa = 0, 1+ o 2+.

Tabla 64. 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 65. 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)

Estudio de los resultados clínicos: KATHERINE

Se investigó el rendimiento del clon 4B5 de HER2 y de INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (ensayo INFORM HER2 Dual ISH) en KATHERINE (BO27938), un estudio clínico multicéntrico, abierto y aleatorizado de fase III para evaluar la eficacia y la seguridad de trastuzumab emtansina (KADCYLA) frente a trastuzumab (Herceptin) como tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama primario positivo en HER2 que padecían un tumor residual patológico presente en la mama o los ganglios linfáticos axilares tras un tratamiento preoperatorio (NCT01772472).

Las muestras del paciente se tiñeron con el clon 4B5 y/o INFORM HER2 Dual ISH y se evaluaron para la aceptabilidad de la tinción y el estado HER2. En general, la mayoría de muestras consistían en una biopsia previa al tratamiento (80.9 %), se recopilaron principalmente a una biopsia (75.3 %) o por métodos quirúrgicos (24.3 %). La mayor parte de las muestras presentaban subtipo neoplásico ductal (95.4 %) y la mayoría no se habían obtenido de una muestra metastásica (96.2 %).

En el estudio KATHERINE se incluyeron 1486 pacientes cuyos resultados mostraban positividad en HER2, con cáncer de mama en etapa temprana con un tumor invasivo residual en la mama o en los ganglios linfáticos axilares y que habían llevado a cabo un tratamiento con taxano y trastuzumab como parte del régimen neoadyuvante antes de la incorporación al ensayo. Los pacientes recibieron radioterapia y/o terapia hormonal simultáneamente al tratamiento del estudio según las directrices locales. Las muestras de tumor de mama debían presentar sobreexpresión de HER2, definida como una puntuación 3+ en IHC o una proporción de amplificación ≥ 2.0 de ISH, que se había establecido en un laboratorio central. Se aleatorizaron los pacientes (1:1) para recibir trastuzumab o KADCYLA. La aleatorización se estratificó por la fase clínica de su presentación, por el estado del receptor de hormona, por la terapia preoperatoria dirigida contra HER2 (trastuzumab, trastuzumab con otros agentes dirigidos contra HER2) y por el estado patológico nodal evaluados con posterioridad al tratamiento preoperatorio.

El criterio de valoración de la eficacia del estudio KATHERINE fue la supervivencia sin cáncer invasivo (IDFS). IDFS se definió como el periodo de tiempo desde la fecha de la aleatorización a la primera presentación de una recidiva de un tumor ipsilateral invasivo de mama, una recidiva del cáncer de mama invasivo ipsilateral local o regional, una metástasis a distancia, un cáncer de mama contralateral invasivo o la muerte por cualquier motivo.

Se observó una mejoría clínica y estadísticamente significativa en la IDFS en los pacientes cuyas muestras de cáncer de mama se identificaron como positivas en HER2 con el ensayo IHC del clon 4B5, que recibieron trastuzumab emtansina (KADCYLA) en comparación con trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, CI del 95 % [0.32, 0.58]), lo que corresponde a una reducción del 57 % del riesgo de un evento de IDFS. Los resultados de eficacia para el subgrupo positivo mediante IHC se muestran en la Tabla 66.

El análisis de los datos también demuestra que, con o sin el ajuste por muestreo diferencial en la población del estudio debido a la preselección local de las pruebas, las estimaciones de eficacia del fármaco son similares.

Tabla 66. Resultados de eficacia de KATHERINE en el subgrupo positivo mediante IHC.

	KADCYLA N = 573	Trastuzumab N = 559
Criterio de valoración primario	Supervivencia sin cáncer invasivo (IDFS) ^a	
Número (%) de pacientes con evento	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [CI del 95 %]	0.43 [0.32, 0.58]	
Índice de casos sin eventos en 3 años (%) ^b	89.0	75.7

^a Datos recogidos del primer análisis provisional

^b El índice de casos sin eventos en 3 años se calculó mediante estimaciones Kaplan-Meier

Los datos del estudio KATHERINE indican que el tratamiento adyuvante con trastuzumab emtansina (KADCYLA) demostró ser claramente beneficioso en comparación con el tratamiento con trastuzumab (Herceptin) en pacientes con cáncer de mama en etapa temprana positivos a HER2 y enfermedad residual tras la finalización de un tratamiento neoadyuvante. El clon 4B5 de HER2 y los ensayos INFORM HER2 Dual ISH resultan útiles para identificar a pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con trastuzumab emtansina (KADCYLA).

Cáncer gástrico

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 de nueva construcción (TMA) que contienen 248 casos de cáncer gástrico (posteriormente se encontraron seis casos duplicados y se eliminaron), y (2) un subgrupo de 183 muestras de ensayos clínicos de Trastuzumab para el ensayo de cáncer gástrico (ToGA) que investigaban el estado HER2 y el resultado clínico en pacientes tratados con Herceptin (trastuzumab). El laboratorio tiñó los casos con el clon 4B5 y HercepTest. Se tiñeron un total de 431 casos con ambos ensayos y (una vez que se habían retirado los casos duplicados) se incorporaron 398 casos únicos a la comparación. 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+. Los índices de concordancia entre el clon 4B5 y HercepTest, para las dos cohortes en estudio, se recogen en la Tabla 67.

Tabla 67. 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 ^a y ToGA ^b	91.0 (87.7-93.4)	82.1 (70.2-90.0)	92.4 (89.1-94.8)
n	362/398	46/56	316/342

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

^a TMA: muestras de tejido de microarray

^b ToGA: muestras de ensayo clínico del ensayo ToGA

Cáncer de las vías biliares

Estudio de resultados clínicos: HERIZON-BTC-01

La eficacia de zanidatamab (ZIIHERA®) y el rendimiento clínico de VENTANA HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody RxDx se evaluaron en la cohorte 1 (n = 62) de ZWI-ZW25-203, un estudio multicéntrico, abierto y de un solo grupo para pacientes con cáncer de las vías biliares (BTC, es decir, adenocarcinoma de la vesícula biliar, colangiocarcinoma intrahepático o colangiocarcinoma extrahepático) metastásico o irresecable avanzado localmente que habían recibido con anterioridad al menos una dosis de quimioterapia sistémica que contenía gemcitabina para su enfermedad avanzada, y habían experimentado progresión del tumor después del tratamiento más reciente o que habían desarrollado intolerancia al mismo, y cuyos tumores habían dado positivo en la prueba de HER2 (IHC 3+).

Los pacientes recibían zanidatamab ZIIHERA® cada 2 semanas en una dosis de 20 mg/kg por vía intravenosa. Se administraba hasta que se presentaba progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. Los principales parámetros de la eficacia de los resultados fueron la tasa de respuesta objetiva confirmada (cORR) y la duración de la respuesta (DoR), según se determinó mediante la revisión central e independiente (ICR) de acuerdo con Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) v1.1.

La supervivencia global media (OS) en la población con IHC 3+ fue de 18.1 meses (CI del 95 %: 12.2, 22.9). La duración media del seguimiento del estudio en la población con IHC 3+ fue de 34.0 meses.

Los resultados de la eficacia se resumen en la Tabla 68.

Tabla 68. Resultados de eficacia de zanidatamab (ZIIHERA®) en ZWI-ZW25-203 para pacientes con BTC

Parámetro de eficacia ^a	n = 62
Tasa de respuesta objetiva confirmada (cORR)	
n	32
% (CI del 95 %)	51.6 (38.6, 64.5)
Respuesta completa, n (%)	3 (4.8)
Respuesta parcial, n (%)	29 (46.8)
Duración de la respuesta (DOR)	n = 32
Mediana ^b , meses (CI del 95 %)	14.9 (7.4, 24.0)

^a Evaluado mediante revisión central e independiente

^b Según la estimación de Kaplan-Meier

CI = intervalo de confianza

Según la última visita del último paciente (11 de julio de 2024)

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de la sesión 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 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

- 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, EGFR, 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.
- Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*. 2000 Dec 11;19(53):6102-14.
- Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, Cunningham MP, Ferrer-Ramón C, Luque-García A, García-Castillo J, Parra-Palau JL, Scaltriti M, Ramón y Cajal S, Baselga J, Arribas J. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biol*. 2009 Jun;29(12):3319-31.
- Tsé C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012 Apr;38(2):133-42.
- Dai SQ, An X, Wang F, Shao Q, Chen YC, Kong YN, Chen C, Li C, Luo HY, Liang Y, Wang FH, Xu RH, Li YH. Serum HER 2 extracellular domain level is correlated with tissue HER 2 status in metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma. *PLoS One*. 2013 May 14;8(5):e63458.

8. Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev.* 2015 Mar;34(1):157-64
9. Carson FL, Cappellano C. *Histotechnology; A Self-Instructional Text*, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
10. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
11. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
12. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
13. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
14. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
15. 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.
16. Hoffmann M, et al. *Histopathology.* 2008;52:797-805.
17. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch.* 2010;457(3):299-307.
18. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
19. 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.
20. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.
21. Ahn S, Woo JW, Lee K, et al. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *J Pathol Trans Med.* 2020;54:34-44.
22. 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.
23. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol.* 1994;47:816-22.
24. 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 USA: consulte elabdoc.roche.com/symbols para obtener más información).



Número mundial de artículo comercial

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev	Actualizaciones
D	Se ha actualizado para incluir BenchMark ULTRA PLUS, la inclusión de HER2 ultrabaja, inclusión de BTC y correcciones administrativas.

PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, INFORM, PATHWAY y ULTRAVIEW son marcas comerciales de Roche. Todos los demás nombres de productos y marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com

