

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

REF 790-4493

05999570001

IVD  50

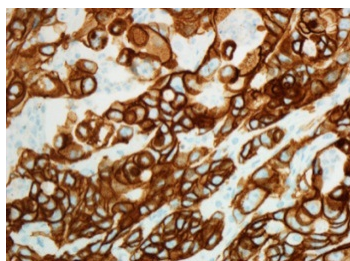


Figura 1. Coloração de VENTANA anti-HER2/neu (4B5) 3+ no carcinoma gástrico.

APLICAÇÃO

O VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)) destina-se a ser utilizado na detecção semi-quantitativa do antígeno HER2 em secções de tecido da mama e gástrico normal e neoplásico fixado em formol e impregnado em parafina, num dispositivo automático de coloração IHC/ISH da VENTANA.

É indicado como um auxiliar da avaliação de doentes com cancro da mama e gástrico para os quais se

considera o tratamento com Herceptin e para doentes com cancro da mama para os quais se consideram tratamento com Kadcyla (trastuzumab emtansine) ou Perjeta (pertuzumab).

Este produto deverá ser interpretado por um patologista qualificado, em conjunto com um exame histológico, a informação clínica relevante e os controlos adequados.

Este anticorpo destina-se a ser utilizado no diagnóstico *in vitro*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

VENTANA O HER2 (4B5) é um anticorpo monoclonal de coelho (clone 4B5) direccionado contra o domínio interno da oncoproteína c-erbB-2 (HER2). A oncoproteína c-erbB-2 foi clonada e caracterizada por Akiyama et al em 1986.¹ É uma glicoproteína transmembranosa com cerca de 185 kD, estruturalmente semelhante ao receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR). A proteína está associada à actividade da tirosina cinase semelhante à de vários receptores do factor de crescimento e à das proteínas de transformação da família src. A sequência de codificação é consistente com o domínio de ligação extracelular e com o domínio de cinase intracelular. Isto sugere que a HER2 pode estar envolvida na transdução do sinal e na estimulação da actividade mitogénica.¹

O clone 4B5 mostrou reagir com uma proteína de 185 kD de lisados celulares de SK-BR-3 através de análises Western Blot. A SK-BR-3 é uma linha celular de carcinoma da mama que apresenta uma expressão 128 vezes superior à do mRNA de HER2.² O tamanho da banda identificada correlaciona-se bem com o indicado para a proteína HER2 (185 kD).¹ Experiências imuno-histoquímicas com linhas celulares transfectadas (HEK293) têm demonstrado que o clone 4B5 produz a coloração de células transfectadas com HER2 e de células transfectadas com HER4. Não se observou a coloração de células transfectadas com HER1 ou HER3. Os dados da análise Western Blot com proteína recombinante HER4 também indicaram que o clone 4B5 reconhece um epítipo de HER4.

No carcinoma da mama, a proteína HER2 expressa-se a um nível detectável pela imuno-histoquímica numa percentagem que chega a atingir os 20% dos adenocarcinomas de vários locais. Entre 15 a 30% dos cancros canaliculares invasivos são positivos para a HER2.³ Quase todos os casos de doença de Paget da mama⁴ e até 90% dos casos de carcinoma canalicular *in situ* do tipo comedião são positivos.³ No carcinoma gástrico, a proteína HER2 expressa-se a um nível detectável pela imuno-histoquímica numa percentagem de até 30% de tipo intestinal, 15% de tipo misto e 5% de cancros gástricos de tipo difuso. A detecção imuno-histoquímica de sobreexpressão da proteína HER2 também é utilizada como auxiliar da determinação dos doentes para os quais é indicada a terapêutica direccionada para HER2.^{5,31-35}

Os resultados da coloração foram avaliados pela Ventana com o clone 4B5 em tecidos normais, em tecidos neoplásicos e em 322 casos de carcinoma da mama. Nos tecidos normais testados, a expressão foi consistente com a literatura publicada, na medida em que não foi observada uma coloração do citoplasma/membrana específica inesperada,

com as seguintes excepções: dois casos de amígdalas demonstraram coloração da membrana das células epiteliais, um caso do paratiróide e um caso do epitélio esofágico. Dos tecidos neoplásicos examinados, foi observada coloração do citoplasma/membrana nas células cancerígenas da mama, cólon e ovários. Foram avaliados trezentos e vinte e dois (322) carcinomas da mama com o clone 4B5 num estudo comparativo de métodos com PATHWAY HER-2/neu (CB11). Existe uma correlação significativa da coloração entre estes dois testes. Consultar a secção Resumo dos resultados previstos para obter informações adicionais. Podem ser consultadas informações adicionais sobre o clone 4B5 nas Referências.²⁴⁻³⁰

A utilização do VENTANA HER2 (4B5) pré-diluído e do /VIEW DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit prontos a utilizar, em combinação com um dispositivo automático de coloração IHC/ISH da VENTANA, reduz a possibilidade de erro humano e da inerente variabilidade resultantes da diluição de reagente individual, da pipetagem manual e da aplicação manual de reagente.

SIGNIFICADO CLÍNICO

O cancro da mama é o carcinoma mais comum que ocorre na mulher e a segunda causa de morte relacionada com o cancro. Na América do Norte, as hipóteses de uma mulher vir a contrair cancro da mama são de uma em oito.⁶ A detecção precoce e o tratamento com terapêuticas apropriadas podem afectar significativamente a taxa geral de sobrevivência.⁷ O cancro gástrico é o quarto cancro mais comum e a segunda causa de morte relacionada com cancro a nível global. A cirurgia é o tratamento mais comum para o cancro do estômago. No entanto, a maioria dos casos de cancro gástrico é detectada numa fase avançada, dificultando frequentemente a realização da cirurgia. A quimioterapia é utilizada para tratar o cancro gástrico avançado, embora a taxa de sobrevivência de doentes com cancro seja muito baixa. Pequenas amostras tecidulares podem ser facilmente utilizadas na imuno-histoquímica (IHC) de rotina, tornando esta técnica, aliada a anticorpos que detectam os antígenos importantes na interpretação dos carcinomas, uma ferramenta eficaz para o patologista no seu diagnóstico e no prognóstico da doença. Actualmente, um importante marcador no cancro da mama e gástrico é a oncoproteína c-erbB-2 (HER2).

A HER2 é uma proteína transmembranar.⁸ Está estreitamente relacionada com o EGFR e, tal como o EGFR, apresenta actividade da tirosina cinase.¹ A amplificação genética e a correspondente sobreexpressão da c-erbB-2 foi encontrada numa variedade de tumores, incluindo os carcinomas da mama e gástrico.^{8,9}

As terapêuticas direccionadas para HER2 demonstraram ser benéficas para alguns doentes com carcinoma da mama e gástrico. Apenas os doentes com carcinomas da mama e gástricos positivos para HER2 devem beneficiar de um tratamento direccionado para HER2. Os diagnósticos *in vitro* para a determinação do estado da HER2 nos carcinomas da mama e gástrico são importantes, pois auxiliam o médico a determinar os doentes elegíveis para tratamento com terapias direccionadas para HER2.

A interpretação dos resultados de qualquer sistema de detecção da HER2 tem que ter em conta o facto de que a HER2 é expressa tanto nos tumores cancerígenos da mama como gástricos e no tecido saudável, embora com níveis e com padrões de expressão diferentes.¹⁰ As preparações de tecido histológico têm a vantagem de a morfologia do tecido intacto auxiliar na interpretação da positividade da HER2 da amostra.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

VENTANA O HER2 (4B5) é um anticorpo monoclonal de coelho que se liga à HER2 nas secções de tecido impregnadas em parafina. O anticorpo específico pode ser localizado por uma formulação de anticorpo secundário conjugado com biotina que reconhece as imunoglobulinas de coelho, seguido pela adição de um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano (HRP) (VIEW DAB Detection Kit) ou de um conjugado de anticorpo secundário com HRP (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). O complexo de anticorpo-enzima específico é então visualizado com um produto de reacção do precipitado da enzima. Cada etapa é então incubada durante um tempo e a uma temperatura específicos. No fim de cada etapa de incubação, as secções são lavadas pelo dispositivo automático de coloração IHC/ISH da VENTANA para parar a reacção e para retirar o material não ligado que prejudicaria a reacção desejada nas etapas subsequentes. O dispositivo aplica igualmente uma solução de protecção Liquid Coverslip para minimizar a evaporação dos reagentes aquosos da lâmina que contém a amostra.

Os casos clínicos devem ser avaliados dentro do contexto de desempenho dos controlos apropriados. A Ventana recomenda a inclusão de um controlo de tecido positivo fixado e processado da mesma forma que a amostra do doente (por exemplo, um carcinoma fraco-positivo da mama ou gástrico). Para além da coloração com VENTANA HER2 (4B5), deve proceder-se à coloração de uma segunda lâmina com CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que o teste seja considerado válido, o tecido

de controlo positivo deve apresentar uma coloração de membrana das células tumorais. Estes componentes devem ser negativos quando corados com CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Além disso, recomendamos que seja incluída uma lâmina de controlo de tecido negativo (por exemplo, um carcinoma da mama ou gástrico negativo para HER2) para cada lote de amostras processadas e executadas no dispositivo automático de coloração IHC/ISH da VENTANA. Este controlo de tecido negativo deve ser corado com VENTANA HER2 (4B5) para assegurar que a intensificação do antígeno e outros procedimentos do tratamento não criaram colorações falsas-positivas.

REAGENTES FORNECIDOS

VENTANA HER2 (4B5) O dispensador contém reagente suficiente para 50 testes.

Um dispensador de 5 ml de VENTANA HER2 (4B5) contém aproximadamente 30 µg de um anticorpo monoclonal de coelho direccionado contra o antígeno de c-erbB-2 humano.

O anticorpo é diluído em 0,05 M de solução salina de tampão Tris, 0,01 M de EDTA, 0,05% de Brij-35 com 0,3% de proteína transportadora e 0,05% de azida de sódio (um conservante). Na solução mãe há vestígios de soro fetal de vitela, aproximadamente 0,25%.

A concentração de proteína total do reagente é de aproximadamente 16 mg/ml. A concentração específica do anticorpo é de aproximadamente 6 µg/ml. O VENTANA HER2 (4B5) consiste em IgG de coelho diluída a partir de sobrenadantes da cultura de tecido.

Consultar o folheto informativo incluído na embalagem do kit de detecção VENTANA apropriado para obter descrições detalhadas sobre: (1) Princípios do procedimento, (2) Materiais e reagentes necessários, mas não fornecidos, (3) Colheita e preparação das amostras para análise, (4) Procedimentos de controlo de qualidade, (5) Resolução de problemas, (6) Interpretação dos resultados e (7) Limitações gerais.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Os reagentes de coloração como os dos kits de detecção VENTANA, e os componentes auxiliares, incluindo lâminas de controlo de tecidos positivos e negativos, não são fornecidos.

Os produtos indicados no folheto informativo podem não estar todos disponíveis em todas as regiões. Consultar o representante de assistência local.

CONSERVAÇÃO

Conservar entre 2 e 8 °C. Não congelar.

Para garantir uma correcta distribuição de reagente e a estabilidade do anticorpo após cada processamento, dever-se-á voltar a colocar a tampa, e o dispensador deverá ser imediatamente colocado no frigorífico em posição vertical.

Cada dispensador de anticorpo tem indicada a respectiva data de validade. Quando correctamente conservado, o reagente permanece estável até à data indicada no rótulo. Não utilizar o reagente depois de ultrapassada a data de validade.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os tecidos processados regularmente, fixados em formol e impregnados em parafina, são adequados para utilização com este anticorpo primário quando utilizados com os kits de detecção VENTANA e dispositivos automáticos de coloração VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA. O fixador de tecido recomendado é o formol neutro tamponado a 10%.²

Devem ser cortadas secções com aproximadamente 4 µm de espessura que serão, posteriormente, colocadas em lâminas de vidro. As lâminas devem ser Superfrost Plus ou equivalente. Os estudos realizados pela Ventana indicam que o tecido cortado seco ao ar e as secções de linhas celulares conservados a 2–8 °C permanecem estáveis durante, pelo menos, 6 meses. Cada laboratório deve validar a estabilidade do corte da lâmina de acordo com os seus próprios procedimentos e condições ambientais de conservação.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro* (IVD).
2. A utilização deste produto para selecção de doentes elegíveis para terapêuticas Kadcyla ou Perjeta poderá não estar disponível em todas as regiões. Consultar o representante local da Roche para confirmar a disponibilidade em locais específicos.
3. Evitar o contacto dos reagentes com os olhos e membranas mucosas. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lavar com água abundante.
4. Os materiais de origem humana ou animal deverão ser manuseados como materiais que constituem perigo biológico e devem ser eliminados com as devidas precauções.
5. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes, pois tal poderá dar origem a resultados incorrectos.

6. Quando utilizado de acordo com as instruções, este produto não é classificado como substância perigosa. O conservante no reagente é a azida de sódio. Os sintomas de exposição excessiva à azida de sódio incluem irritação cutânea e dos olhos, bem como irritação das membranas mucosas e do tracto respiratório superior. A concentração de azida de sódio neste produto é de 0,05% e não atinge os critérios OSHA para classificação como substância perigosa. A acumulação de NaN₃ pode reagir com as canalizações de chumbo e cobre dando origem a azidas metálicas altamente explosivas. Durante a eliminação, juntar com grande volume de água para evitar a acumulação de azida na canalização.¹² É possível a ocorrência de reacções alérgicas sistémicas em indivíduos sensíveis.
7. Consultar as autoridades locais ou estatais no que se refere ao método de eliminação recomendado.
8. Consultar a ficha de dados de segurança do produto para obter informações adicionais.

PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

Os anticorpos primários da VENTANA foram desenvolvidos para utilização em dispositivos de coloração automáticos VENTANA BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA em combinação com os kits de detecção VENTANA e acessórios. Consultar a Tabela 1 e Tabela 2 para os protocolos de coloração recomendados.

Este anticorpo foi optimizado para tempos de incubação específicos, mas o utilizador terá de validar os resultados obtidos com este reagente.

Os parâmetros para os procedimentos automáticos podem ser apresentados, impressos e editados de acordo com o procedimento no Manual do Operador do instrumento.

Consultar o folheto informativo incluído na embalagem do kit de detecção VENTANA adequado, para obter mais informações relativamente aos procedimentos de coloração imuno-histoquímica.

Tabela 1. Protocolo de coloração recomendado para o VENTANA HER2 (4B5) com VIEW DAB Detection Kit num instrumento BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT e instrumento BenchMark ULTRA.

Tipo de procedimento	Método		
	Instrumento BenchMark e BenchMark GX	Instrumento BenchMark XT	Instrumento BenchMark ULTRA
Desparafinação	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Cell Conditioning (revelação de antígeno)	Cell Conditioning 1, Padrão	Cell Conditioning 1, Padrão	ULTRA CC1, moderado
Anticorpo (primário)	32 minutos, 37 °C	32 minutos, 37 °C	24 minutos, 36 °C
A/B Block (bloqueio da biotina)	Não seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Contrastante (hematoxilina)	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Pós-contrastante	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

Tabela 2. Protocolo de Coloração Recomendado para VENTANA HER2 (4B5) com ultraView DAB Detection Kit num instrumento. BenchMark, BenchMark GX, BenchMark XT e BenchMark ULTRA.

Tipo de procedimento	Método	
	Instrumento BenchMark, BenchMark GX e BenchMark XT	Instrumento BenchMark ULTRA
Desparafinação	Seleccionado	Seleccionado
Cell Conditioning (revelação de antígeno)	Cell Conditioning 1, moderado	ULTRA CC1, moderado
Anticorpo (primário)	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
ultraWash	Seleccionado	Seleccionado
Contrastante	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Pós-contrastante	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

Controlos do sistema de linha celular

A Ventana tem disponível, como produto separado, quatro controlos de linha celular fixados em formol, impregnados em parafina, seccionados e colocados numa única lâmina carregada. As lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1 (referência 781-2991) podem ser úteis para uma validação preliminar do método de processamento utilizado para a coloração de lâminas com VENTANA HER2 (4B5). Estes quatro controlos de linha celular são caracterizados pela hibridação *in situ* para o número de cópias genéticas. Quando processadas e coradas de forma apropriada, as linhas celulares devem apresentar uma coloração como a descrita na Tabela 4. Se a coloração indicada não for evidente nos núcleos apropriados, especialmente os controlos 1+ e 2+, deve repetir-se a coloração dos tecidos.

Tabela 3. Características das lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1

Pontuação IHC de HER2	Linha celular	Relação HER2/Chr17*
0	MDA-MB-231	1,11
1+	T47D	1,12
2+	MDA-MB-453	2,66
3+	BT-474	5,53

* A relação HER2/Chr17 é uma média de três lotes de lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1 determinada utilizando a hibridação por fluorescência *in situ* (FISH).

Controlo tecidual positivo

Deve ser processado um tecido de controlo positivo, que tenha sido fixado e processado da mesma forma que as amostras do doente, para cada conjunto de condições de teste e com cada procedimento de coloração VENTANA HER2 (4B5) realizado. Este tecido poderá conter componentes ou células de coloração negativa e positiva e servir como tecido de controlo positivo e negativo. Os tecidos de controlo deverão ser amostras recém-colhidas de autópsia, biópsia ou cirurgia, preparados ou fixados o mais cedo possível de forma idêntica às secções de teste. Tais tecidos poderão monitorizar todas as etapas da análise, desde a preparação dos tecidos até à coloração. A utilização de uma secção de tecido fixado ou processado de forma diferente da amostra de teste facultará um controlo para todos os reagentes e etapas do método, excepto para a fixação e preparação de tecidos. Um tecido com coloração positiva fraca é mais adequado do que um tecido com coloração positiva intensa para um controlo de qualidade ideal e para a detecção de níveis reduzidos de degradação dos reagentes. Idealmente, deve escolher-se um tecido que se saiba ter uma coloração fraca mas positiva para assegurar que o sistema é sensível a pequenas quantidades de degradação de reagente ou problemas com a metodologia IHC. Geralmente, no entanto, o tecido neoplásico positivo

para HER2 é fortemente positivo devido à natureza da patologia (sobreexpressão). Um exemplo de um controlo positivo para HER2 (4B5) é um carcinoma da mama invasivo conhecido como sendo fraco-positivo para HER2 ou uma amostra de carcinoma gástrico fraco-positivo. Os componentes tecidulares com coloração positiva (coloração membranosa das células neoplásicas) são utilizados para confirmar a aplicação do anticorpo e o correcto funcionamento do instrumento.

Os controlos tecidulares positivos conhecidos deverão ser utilizados apenas para monitorizar o correcto desempenho dos tecidos processados e dos reagentes de teste, e não para auxiliar na determinação de um diagnóstico específico de amostras de doentes.

Controlo tecidual negativo

Poderá ser utilizado como controlo tecidual negativo a mesma lâmina utilizada para o controlo tecidual positivo (carcinoma da mama invasivo canalicular ou lobular ou carcinoma gástrico). Os componentes sem coloração (estroma circundante, células linfóides e vasos sanguíneos) deverão demonstrar a ausência de coloração específica e fornecer uma indicação de coloração específica de fundo (resultado falso positivo) com o anticorpo primário. Utilizar um tecido conhecido negativo, fixado, processado e impregnado de forma idêntica à(s) amostra(s) do doente.

Controlo de reagente negativo

Deverá ser processado um controlo de reagente negativo para cada amostra, para auxiliar na interpretação dos resultados. É utilizado um controlo de reagente negativo em vez do anticorpo primário para avaliar a coloração não específica. Deve proceder-se à coloração da lâmina com CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. O período de incubação do controlo de reagente negativo deverá ser igual ao período de incubação do anticorpo primário.

Discrepâncias inexplicáveis

As discrepâncias inexplicadas nos controlos devem ser mencionadas, de imediato, ao seu representante de assistência local. Se os resultados do controlo de qualidade não estiverem em conformidade com as especificações, os resultados dos doentes são inválidos. Consultar a secção de Resolução de problemas deste folheto. Identificar e corrigir o problema e, em seguida, repetir as amostras dos doentes.

Verificação do ensaio

Antes da primeira utilização de um anticorpo ou de um sistema de coloração num procedimento de diagnóstico, a especificidade do anticorpo deverá ser verificada através de testes numa série de tecidos com características de desempenho imuno-histoquímicas conhecidas, representando tecidos conhecidos positivos e negativos (consultar os Procedimentos de controlo de qualidade anteriormente descritos nesta secção do folheto informativo, bem como as recomendações de Controlo de Qualidade do College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist¹³ e a norma CLSI Approved Guideline¹⁴). Estes procedimentos de controlo de qualidade devem ser repetidos para cada novo lote de anticorpo ou sempre que houver alterações nos parâmetros do ensaio. Os tecidos de cancro da mama e gástrico com um estado de HER2 conhecido são adequados para a verificação do ensaio.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O procedimento automático de imuno-coloração da VENTANA provoca a precipitação de um produto de reacção de cor castanha (DAB) nos locais do antígeno identificados pelo VENTANA HER2 (4B5). Um patologista qualificado com experiência em procedimentos imuno-histoquímicos tem que avaliar os controlos e qualificar o produto corado antes de interpretar os resultados.

Controlos positivos

O controlo tecidual corado positivo deverá ser examinado primeiro para conferir que todos os reagentes estão a funcionar correctamente. A presença de um produto de reacção com coloração correcta dentro da membrana das células alvo indica uma reactividade positiva. Dependendo da duração da incubação e da potência da hematoxilina utilizada, a contra-coloração resultará numa coloração azul clara a escura dos núcleos das células. A adição excessiva ou insuficiente de contrastante pode comprometer a interpretação correcta dos resultados.

Se o controlo tecidual positivo não demonstrar uma coloração positiva, quaisquer resultados das amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

Controlos tecidulares negativos

O controlo tecidual negativo deverá ser examinado depois do controlo tecidual positivo para verificar a identificação específica do antígeno alvo pelo anticorpo primário. A ausência de coloração específica no controlo tecidual negativo confirma a inexistência de reactividade cruzada do anticorpo relativamente às células ou componentes celulares. Se ocorrer uma coloração específica no controlo tecidual negativo, os resultados da amostra do doente deverão ser considerados inválidos.

Controlos de reagente negativo

A coloração não específica, se existente, terá uma aparência difusa. Poderá ser igualmente observada uma coloração ligeira esporádica do tecido conjuntivo em secções de tecidos excessivamente fixadas em formol. Deverão ser utilizadas células intactas para a interpretação dos resultados da coloração, uma vez que as células necróticas ou degeneradas, muitas vezes, coram de forma não específica.

Tecido do doente

As amostras do doente deverão ser examinadas em último lugar. A intensidade da coloração positiva deverá ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como acontece com qualquer teste de imuno-histoquímica, um resultado negativo significa que o antígeno em questão não foi detectado, e não que o antígeno não existe nas células ou tecidos analisados.

Ao interpretar qualquer resultado de imuno-histoquímica, a morfologia de cada amostra de tecido deverá ser igualmente examinada utilizando uma secção corada com hematoxilina e eosina. Os resultados morfológicos e os dados clínicos pertinentes do doente devem ser interpretados por um patologista qualificado.

INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO

Convenções de pontuação para a interpretação do VENTANA HER2 (4B5) no carcinoma da mama

Os carcinomas da mama considerados positivos para a sobreexpressão da proteína HER2 têm de ir ao encontro do limiar dos critérios para a intensidade de coloração (2+ ou superior numa escala de 0 a 3+) e da percentagem de células de tumor positivas (superior a 10%). A coloração tem também de localizar a membrana celular. A coloração citoplásmica pode ainda estar presente, mas esta coloração não está incluída na determinação da positividade. Examinar a secção de tecido completa para garantir a pontuação apenas em áreas bem preservadas e bem coradas. A coloração que rodeia totalmente a membrana citoplásmica deve ser pontuada como uma intensidade de "2+" ou "3+". A coloração parcial da membrana deve ser pontuada como "1+". Poderá ser necessário examinar os casos borderline com uma ampliação de 40X ou mais para discriminar entre intensidades de "1+" e "2+". Em contraste com casos pontuados com uma intensidade de 3+, a coloração pontuada com 2+ tem um anel mais vivo e mais bem delineado, ao passo que os casos pontuados com 3+ apresentam um contorno bastante compacto. Em baixo poderá ver um quadro de referência rápida para os critérios de coloração. Consultar o *Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma* para obter uma descrição mais detalhada com fotografias de coloração com VENTANA HER2 (4B5).

Tabela 4. Critérios para a intensidade e padrão de coloração da membrana celular com VENTANA HER2 (4B5) no carcinoma da mama.

Padrão de coloração	Pontuação (apresentar ao médico assistente)	Avaliação da coloração de HER2
Não é observada coloração da membrana	0	Negativa
Coloração esbatida e parcial da membrana em qualquer proporção das células cancerígenas	1+	Negativa
Coloração completa fraca da membrana, superior a 10% das células cancerígenas	2+	Equívoco*
Coloração completa intensa da membrana, superior a 10% das células cancerígenas	3+	Positiva

*Reflexo recomendado para ISH

Convenções de pontuação para a interpretação de VENTANA HER2 (4B5) no carcinoma gástrico

Os carcinomas gástricos considerados positivos para a sobreexpressão da proteína HER2 têm de ir ao encontro do limiar dos critérios para a intensidade e padrão de coloração da membrana (2+ ou superior numa escala de 0 a 3+) e da percentagem de

células tumorais positivas. A coloração tem de localizar a membrana celular, mas não tem de cobrir a circunferência completa, uma vez que a coloração basolateral é regularmente observada e deverá ser considerada na pontuação. A coloração do citoplasma e/ou do núcleo pode estar presente, mas esta coloração não é incluída na determinação de positividade. No carcinoma gástrico, a percentagem de células tumorais positivas depende de a amostra se tratar de uma amostra de biópsia (≥ 5 células coesas) ou de uma amostra de ressecção ($\geq 10\%$).

Aquando da definição das directrizes de pontuação para a imuno-histoquímica da HER2 no cancro gástrico¹⁵, ter em consideração que embora uma coloração membranosa intensa constitua uma evidência da sobreexpressão da proteína HER2 em células neoplásicas, não é necessário que seja completamente circunferencial.

Rüschhoff et al referiram uma coloração citoplásmica difusa com ou sem coloração nuclear no cancro gástrico.¹⁶ Apenas a coloração membranosa deverá ser utilizada na determinação da expressão da proteína HER2 no cancro gástrico.

A coloração imuno-histoquímica com o clone 4B5 pode produzir uma coloração citoplásmica e nuclear da mucosa gástrica normal e, mais raramente, das células neoplásicas no carcinoma gástrico e no carcinoma gastro-esofágico. Actualmente, desconhece-se a natureza desta coloração citoplásmica e nuclear. Este padrão de coloração não deve ser confundido com a coloração membranosa discreta, que é indicativa de positividade de HER2 nas células neoplásicas.

Consultar o *Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody staining of breast and gastric carcinoma* para obter uma descrição mais detalhada com fotomicrografias de coloração com VENTANA HER2 (4B5).

Tabela 5. Critérios para a intensidade e padrão de coloração da membrana celular com VENTANA HER2 (4B5) no carcinoma gástrico.

Padrão de coloração - Amostra de ressecção	Padrão de coloração - Amostra de biópsia	Pontuação (apresentar ao médico requisitante)	Avaliação da coloração de HER2
Sem reactividade ou reactividade membranosa em $<10\%$ das células tumorais	Sem reactividade ou reactividade membranosa em qualquer célula tumoral	0	Negativa
Reactividade membranosa esbatida/quase imperceptível em $\geq 10\%$ das células tumorais; as células são reactivas apenas em parte da membrana	Agrupamento de células tumorais* com uma reactividade membranosa esbatida/quase imperceptível, independentemente da percentagem de células tumorais coradas	1+	Negativa
Reactividade membranosa basolateral ou lateral fraca a moderadamente completa em $\geq 10\%$ das células tumorais	Agrupamento de células tumorais com uma reactividade membranosa basolateral ou lateral fraca a moderadamente completa, independentemente da percentagem de células tumorais coradas	2+	Equívoco**
Reactividade membranosa basolateral ou lateral intensa e completa em $\geq 10\%$ das células tumorais	Agrupamento de células tumorais com uma reactividade membranosa basolateral ou lateral intensa e completa, independentemente da percentagem de células tumorais coradas	3+	Positiva

* ≥ 5 células coesas

** Reflexo recomendado para ISH

LIMITAÇÕES

Limitações gerais

1. A imuno-histoquímica é um processo de diagnóstico de várias etapas que exige uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados, selecções de tecidos, fixação, processamento, preparação da lâmina imuno-histoquímica e interpretação dos resultados da coloração.
2. A coloração do tecido depende do manuseamento e do processamento do tecido antes da coloração. Uma incorrecta fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento, sectionamento ou contaminação com outros tecidos ou fluidos pode produzir artefactos, aprisionamento de anticorpos ou resultados falsos negativos. Os resultados inconsistentes podem ser resultantes de variações nos métodos de fixação e impregnação ou de irregularidades inerentes ao tecido.
3. A adição excessiva ou insuficiente de contrastante pode comprometer a interpretação correcta dos resultados.
4. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou da sua ausência, tem que ser avaliada dentro do contexto do historial clínico, morfologia e outros critérios histopatológicos. A interpretação clínica de qualquer coloração, ou da sua ausência, tem que ser complementada por meio de estudos morfológicos e controlos adequados, bem como por meio de outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade de um patologista qualificado estar familiarizado com os anticorpos, reagentes e métodos utilizados na interpretação da preparação corada. A coloração tem de ser realizada num laboratório licenciado, certificado, mediante a supervisão de um anatomopatologista responsável pela análise das lâminas coradas e que assegure a adequação dos controlos positivos e negativos.
5. A Ventana fornece anticorpos e reagentes com uma diluição ideal para serem utilizados quando se seguem as instruções fornecidas. Qualquer desvio dos procedimentos de teste recomendados pode invalidar os resultados previstos. Tem de ser utilizados e documentados os controlos apropriados. Os utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados terão de aceitar a responsabilidade da interpretação dos resultados dos doentes.
6. Este produto não se destina a ser utilizado na citometria de fluxo, as características de desempenho não foram determinadas.
7. Os reagentes podem demonstrar reacções inesperadas em tecidos não testados anteriormente. A possibilidade de surgirem reacções inesperadas, mesmo nos grupos de tecidos testados, não pode ser totalmente eliminada devido à variabilidade biológica da expressão de antígenos em neoplasias ou outros tecidos patológicos.¹⁷ Contactar o representante de assistência local para comunicar quaisquer reacções inesperadas documentadas.
8. Os tecidos de indivíduos infectados com o vírus da hepatite B e contendo o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) podem apresentar uma coloração não específica com peroxidase de rábano.¹⁸
9. Poderão observar-se resultados falsos positivos devido a ligação não imunológica de proteínas ou produtos de reacção dos substratos. Tais resultados poderão igualmente ser provocados por actividade de pseudo-peroxidase (eritrócitos), actividade de peroxidase endógena (citocromo C) ou biotina endógena (exemplo: fígado, cérebro, mama, rim) dependendo do tipo de imuno-corante utilizado.¹⁹
10. Tal como acontece com qualquer teste de imuno-histoquímica, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno não existia nas células ou tecidos analisados.

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS

1. O anticorpo foi optimizado conforme indicado nas tabelas 1 e 2 para plataformas e químicas de detecção da VENTANA. Devido à variação na fixação e processamento dos tecidos, poderá ser necessário aumentar ou diminuir o tempo de incubação do anticorpo primário em amostras individuais. Para obter mais informações sobre as variáveis de fixação, consultar "Immunohistochemistry Principles and Advances".²⁰
2. O anticorpo, em combinação com os kits de detecção VENTANA e acessórios, detecta o antígeno que sobrevive à fixação em formol, processamento de tecidos e sectionamento de rotina. Os utilizadores que se desviem dos procedimentos de teste recomendados são responsáveis pela interpretação e validação dos resultados dos doentes.
3. A medula óssea não foi testada quanto à especificidade. O utilizador deve determinar a coloração apropriada nos tecidos mencionados acima antes da interpretação das informações de coloração.
4. A coloração imuno-histoquímica com o clone 4B5 pode produzir uma coloração citoplasmática e nuclear da mucosa gástrica normal e, mais raramente, das células

neoplásicas no carcinoma gástrico e no carcinoma gastro-esofágico. Actualmente, desconhece-se a natureza desta coloração citoplasmática e nuclear. Este padrão de coloração não deve ser confundido com a coloração membranosa discreta, que é indicativa de positividade de HER2 nas células neoplásicas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O desempenho do anticorpo VENTANA HER2 (4B5) foi avaliado através da realização de estudos comparativos de métodos, especificidade e reprodutibilidade. Todos os procedimentos de coloração foram realizados utilizando o protocolo IVIEW DAB Detection Kit referido acima num dispositivo automático de coloração Benchmark XT, a menos que especificado de outro modo. Os dados apresentados referem-se primeiro ao carcinoma da mama e, em seguida, aos carcinomas gástricos.

1. Especificidade: A especificidade do clone 4B5 foi determinada por um estudo que não apresentou coloração específica da membrana para a maioria dos tecidos normais. Os resultados de coloração foram os seguintes: tecido supra-renal (0/3), mama (0/3), cerebelo (0/3), cérebro (0/3), colo uterino (0/3), cólon (0/3), esófago (1/3), coração (0/2), rins (0/3), fígado (0/3), pulmão (0/3), células mesoteliais (0/3), ovários (0/3), pâncreas (0/3), paratiróide (1/3, coloração da membrana focal), nervos periféricos (1/3), hipófise (0/2), próstata (1/3), glândula salivar (0/3), músculo-esquelético (0/3), pele (0/3), intestino delgado (0/3), baço (0/3), estômago (0/3), testículos (0/3), timo (0/2), tireóide (0/3), amígdalas (2/3 coloração focal das células epiteliais de superfície) e útero (0/3).

A especificidade do clone 4B5 foi também determinada por um estudo que não apresentou coloração específica da membrana na maioria dos tecidos neoplásicos. Os resultados de coloração foram os seguintes: cancro da mama (1/4), carcinóide (0/2), cancro do cólon (1/3), cancro hepatocelular (0/5), leiomioma (0/2), cancro do pulmão (0/2), linfoma (0/3), melanoma (0/2), cancro dos ovários (1/2), cancro pancreático (0/3), cancro da próstata (0/3), cancro das células renais (0/5), sarcoma (0/2), cancro do estômago (0/3), cancro da tireóide (0/3) e cancro indiferenciado (0/1).

A coloração positiva no epitélio das amígdalas, epitélio esofágico, próstata, nervos periféricos, paratiróide, cancro da mama, cólon e cancro dos ovários são consistentes com a literatura publicada relativamente à expressão de HER2.

2. Sensibilidade: A sensibilidade é demonstrada nas Tabelas 9 e 11: Pontuações de IHC consensuais de três patologistas para o clone 4B5 em comparação com FISH.
3. A reprodutibilidade da coloração intra-ensaio nas plataformas dos instrumentos de coloração BenchMark e BenchMark XT foi determinada através da coloração de três lâminas, cada uma de cinco tecidos de cancro da mama com uma pontuação relativa à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+. Para cada caso, três de 3 lâminas apresentaram uma coloração apropriada em cada ensaio e para todas as plataformas de instrumentos testadas. Os utilizadores deverão verificar a reprodutibilidade dos resultados intra-ensaio corando vários conjuntos de secções em série com uma densidade de antígeno baixa, média e alta num único ensaio.
4. A reprodutibilidade da coloração inter-ensaio e inter-plataforma foi determinada através da coloração de três lâminas, cada uma de cinco tecidos de cancro da mama com uma pontuação relativa à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+ em ensaios em três instrumentos diferentes nas plataformas dos instrumentos BenchMark e BenchMark XT. Para cada caso, nove de 9 lâminas apresentaram uma coloração apropriada nos ensaios nos três instrumentos e em todas as plataformas de instrumentos testadas.
5. Reprodutibilidade de pontuação inter-leitor e de coloração inter-laboratorial com BenchMark XT: No estudo de reprodutibilidade inter-laboratorial participaram três laboratórios. Foram enviadas para cada um dos locais lâminas de cortes de 40 casos de carcinomas da mama invasivos fixados em formol neutro tamponado [10 cada de cada categoria de colocação em lote de HER2 (0-1+, 2+, 3+)] e seis (6) lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1 para se proceder à coloração numa plataforma automática de coloração VENTANA BenchMark XT, utilizando o protocolo de coloração recomendado. Os controlos incluídos nas lâminas PATHWAY HER-2 4 em 1 e uma segunda lâmina de cada caso apresentaram coloração com reagente negativo para Ig. Nenhum local observou ensaios inválidos, com base no desempenho dos controlos. Os resultados foram analisados pela Ventana. Trinta e quatro de quarenta (34/40) lâminas apresentaram uma intensidade de coloração semelhante nos vários locais de coloração. Seis amostras (6/40 ou 15%) não variaram mais do que 1 nível de intensidade. Três (3/6) amostras variaram entre 0 e 1+, sendo ambas consideradas negativas. Duas amostras (2/40 ou 5%) variaram entre 2+ e 3+ e uma amostra (1/40) variou entre 1+ e 2+.

6. Reprodutibilidade de pontuação inter-leitor com o instrumento BenchMark XT: Em todos os 40 casos (100%), verificou-se uma concordância de, no mínimo, 2 de 3 patologistas.
7. A reprodutibilidade de lote para lote foi determinada através da coloração automática de 5 tecidos de cancro da mama com pontuações relativas à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+ com 3 lotes de HER2 (4B5). Os tecidos corados foram pontuados numa escala de 0 a 3+ por três leitores qualificados. Verificou-se uma concordância de 100% entre os lotes e leitores para as 3 lâminas e 5 tecidos corados.
8. Estudos comparativos entre o anticorpo monoclonal de coelho do clone 4B5 e o anticorpo monoclonal de rato do clone PATHWAY HER-2/neu (CB11): Resumo dos estudos realizados. Foi realizado um estudo comparativo de métodos com vista a examinar a correlação entre o clone 4B5 e o PATHWAY HER-2/neu (CB11) e PathVysion Her-2 FISH, sendo ambos testes de diagnóstico anteriormente aprovados pela FDA. No estudo participaram seis investigadores. Dois conjuntos de três investigadores diferentes avaliaram dois grupos independentes (Grupo 1: n = 178, Grupo 2: n = 144) utilizando casos de cancro da mama conhecidos corados com PATHWAY HER-2/neu (CB11) e clone 4B5. Os dados FISH foram obtidos a partir do historial dos doentes. Foi criada uma pontuação consensual, dos três leitores para cada anticorpo, para cada caso para reduzir a variabilidade intra-leitor conhecida por existir com a pontuação para HER2.^{21,22,23} No total, foram avaliados 322 casos. As lâminas coradas com o PATHWAY HER-2/neu (CB11) foram processadas e apresentaram uma coloração de acordo com as instruções do fabricante especificadas no folheto informativo do PATHWAY HER-2/neu (CB11). Observou-se uma média de aproximadamente um ano entre a coloração e leitura das lâminas coradas com PATHWAY HER-2/neu (CB11). Uma vez que as pontuações de um dos seis leitores se encontrava fora do intervalo de confiança (IC), os dados dos dois grupos são apresentados da seguinte forma:

Reprodutibilidade inter-patologista das amostras dos estudos comparativos

Tabela 6. Grupo 1: Pontuações de IHC consensuais de três patologistas.

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

Grupo 1: Características de desempenho para a Apresentação 3x3.

A concordância global é 29+13+53/143 = 66,4% (IC de 95% = 38,6%, 59,7%).

Grupo 1: Características de desempenho para a Apresentação 2x2 [pontuações combinadas de resultados positivos (2+ e 3+) e negativos (0+ e 1+) para o anticorpo HER2].

- A percentagem de concordância positiva é 29+2+24+13/31+37 = 100% (IC de 95% = 97,5% – 100%).
- A percentagem de concordância negativa é 53/75 = 70,7% (IC de 95% = 58,5% – 80,1%).

A concordância global é 29+24+2+13+53/143 = 84,7% (IC de 95% = 78,2% – 90,0%).

Tabela 7. Grupo 2: Pontuações de IHC consensuais de três patologistas.

Pontuação do clone 4B5	Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Total	73	20	85	178

Grupo 2: Características de desempenho para a Apresentação 3x3.

A concordância global é 72+12+80/178 = 92,1% (IC de 95% = 80,1%, 93,1%).

Grupo 2: Características de desempenho para a Apresentação 2x2 [pontuações combinadas de resultados positivos (2+ e 3+) e negativos (0+ e 1+) para o anticorpo HER2].

- A percentagem de concordância positiva é 72+12+1+1/73+20 = 92,5% (IC de 95% = 85,2% – 96,9%).
- A percentagem de concordância negativa é 80/85 = 94,1% (IC de 95% = 86,8% – 98,1%).

A concordância global é 72+12+1+1+80/178 = 93,3% (IC de 95% = 88,5% – 96,4%).

Tabela 8. Grupo 1: Pontuações de IHC de PATHWAY HER-2/neu (CB11) consensuais de três patologistas em comparação com FISH.

Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11)	Resultado FISH		
	Positivo	Negativo	Total
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Total	86	58	144

Grupo 1: Características de desempenho para PATHWAY HER-2/NEU (CB11) e FISH, Apresentação 2x2 (na qual as pontuações de 2 e 3 são consideradas positivas).

- A percentagem de concordância positiva é 32+32/ 86 = 74,4% (IC de 95% = 63,8% – 83,2%).
- A percentagem de concordância negativa é 53/58 = 91,4% (IC de 95% = 80,9% – 97,1%).

A concordância global é 32+32+53/144 = 81,2% (IC de 95% = 73,9% – 87,2%).

Tabela 9. Grupo 1: Pontuações de IHC consensuais de três patologistas para o clone 4B5 em comparação com FISH

Pontuação do clone 4B5	Resultado FISH		
	Positivo	Negativo	Total
3+	55	3	58
2+	25	8	33
0, 1+	6	47	53
Total	86	58	144

Grupo 1: Características de desempenho para o clone 4B5 e FISH, Apresentação 2x2 (na qual as pontuações de 2 e 3 são consideradas positivas).

- A percentagem de concordância positiva é 55+25/ 86 = 93,0% (IC de 95% = 87,9% – 96,3%).
- A percentagem de concordância negativa é 47/58 = 81,0% (IC de 95% = 73,4% – 86,0%).

A concordância global é 55+25+47/144 = 88,2% (IC de 95% = 82,1% – 92,2%).

Tabela 10. Grupo 2: Pontuações de IHC de PATHWAY HER-2/neu (CB11) consensuais de três patologistas em comparação com FISH.

Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11)	Resultado FISH		
	Positivo	Negativo	Total
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Total	93	85	178

Grupo 2: Características de desempenho para PATHWAY HER-2/neu (CB11) e FISH, Apresentação 2x2 (na qual as pontuações de 2 e 3 são consideradas positivas).

- A percentagem de concordância positiva é $72+13/93 = 91,3\%$ (IC de 95% = 85,0% – 96,7%).
- A percentagem de concordância negativa é $77/85 = 90,6\%$ (IC de 95% = 83,9% – 96,3%).

A concordância global é $72+13+77/178 = 91,0\%$ (IC de 95% = 86,5% – 94,9%).

Tabela 11. Grupo 2: Pontuações de IHC consensuais de três patologistas para o clone 4B5 em comparação com FISH

Pontuação do clone 4B5	Resultado FISH		
	Positivo	Negativo	Total
3+	72	1	73
2+	11	7	18
0, 1+	10	77	87
Total	93	85	178

Grupo 2: Características de desempenho para o clone 4B5 e FISH, Apresentação 2x2 (na qual as pontuações de 2 e 3 são consideradas positivas).

- A percentagem de concordância positiva é $72+11/93 = 89,2\%$ (IC de 95% = 82,5% – 95,1%).
- A percentagem de concordância negativa é $77/85 = 90,6\%$ (IC de 95% = 84,0% – 96,4%).

A concordância global é $72+11+77/178 = 90,0\%$ (IC de 95% = 85,4% – 93,6%).

Reprodutibilidade inter-patologista das amostras dos estudos comparativos

Uma vez que é bem conhecido que patologistas diferentes poderão ter interpretações diferentes das lâminas de imuno-histoquímica, estiverem envolvidos três patologistas para cada um dos dois grupos (para um total de 6 patologistas) na leitura de todas as amostras. Foi utilizada uma regra de dois em três para decidir os resultados finais. Em seguida, é apresentado um resumo dos resultados variáveis obtidos pelos três patologistas das amostras do estudo comparativo para cada grupo.

Tabela 12. Grupo 1: Pontuação do clone 4B5 para os três patologistas.

Pontuação HER2	Pontuação do clone 4B5		
	Investigador 1	Investigador 2	Investigador 3
3+	72	70	73
2+	22	19	18
0,1+	80	89	87
Total	174	178	178

Nota: Um total de 3 amostras variou em mais do que um nível de graduação (i.e., 0, 2+) aquando da avaliação pelos três patologistas.

Amostra 1: Um patologista pontuou 2+, dois patologistas pontuaram 0+.

Amostra 2: Um patologista pontuou 0, dois patologistas pontuaram 2+.

Amostra 3: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 1+ e o terceiro 2+.

Tabela 13. Grupo 1: Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11) para os três patologistas.

Pontuação HER2	Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11)		
	Investigador 1	Investigador 2	Investigador 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Total	174	178	178

Nota: Um total de 1 amostra variou em mais do que um nível de graduação (ou seja, 1 - 3+) aquando da avaliação pelos três patologistas.

Amostra 1: Um patologista pontuou 1+, o segundo pontuou 2+ e o terceiro 3+.

Tabela 14. Grupo 2: Pontuação do clone 4B5 para os três patologistas.

Pontuação HER2	Pontuação do clone 4B5		
	Investigador 4	Investigador 5	Investigador 6
3	59	65	50
2	30	28	39
0,1	52	51	55
Total	141	144	144

Nota: Um total de 6 amostras variou em mais do que um nível de graduação (por exemplo, 0, 3+) aquando da avaliação pelos três patologistas.

Amostra 1: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 0+ e o terceiro 2+.

Amostra 2: Um patologista pontuou 1+, o segundo pontuou 1+ e o terceiro 3+.

Amostra 3: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 2+ e o terceiro 2+.

Amostras 4 e 5: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 2+ e o terceiro 2+.

Amostra 6: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 3+ e o terceiro 3+.

Tabela 15. Grupo 2: Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11) para os três patologistas.

Pontuação HER2	Pontuação do PATHWAY HER-2/neu (CB11)		
	Investigador 4	Investigador 5	Investigador 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Total	144	144	144

Nota: Um total de 8 amostras variou em mais do que um nível de graduação (i.e., 0 - 2+) aquando da avaliação pelos três patologistas.

Amostras 1 – 6: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 1+ e o terceiro 2+.

Amostras 7 e 8: Um patologista pontuou 0+, o segundo pontuou 2+ e o terceiro 2+.

Em seguida é apresentada uma tabulação dos intervalos de percentagem de concordância entre pares de patologistas (três pares para cada grupo).

Tabela 16. Intervalos de concordâncias de 2X2* para os três patologistas.

	Percentagem de concordância global	Percentagem de concordância positiva	Percentagem de concordância negativa
Clone 4B5 vs. PATHWAY HER-2/neu (CB11)			
Grupo 1	82,6 – 86,9%	97,3 – 100,0%	68,0% - 75,4%
Grupo 2	88,2 – 95,5%	87,6 – 95,6%	86,1 – 95,4%
Clone 4B5 vs. FISH			
Grupo 1	86,8 – 88,2%	90,7 – 94,2%	79,3 – 81,0%
Grupo 2	87,4 – 89,9%	88,2 – 90,0%	84,5 – 91,8%
PATHWAY HER-2/neu (CB11) vs. FISH			
Grupo 1	79,9 – 84,0%	73,3 – 80,2%	89,7 – 89,7%
Grupo 2	84,8% - 93,3%	86,7 – 92,5%	82,7 – 94,1%

* 0, 1+ = Negativo. 2+ e 3+ = Positivo.

Conclusão: Os dados obtidos com estes estudos indicaram que o anticorpo primário do clone 4B5 era específico e reprodutível em termos da sua capacidade de localizar a coloração de membrana específica para tecidos normais e neoplásicos. Os dados de comparação dos métodos demonstraram que o anticorpo primário do clone 4B5 é indicado como um auxiliar da avaliação de doentes com cancro da mama para os quais se considera o tratamento com Herceptin.

9. Características de desempenho do instrumento BenchMark ULTRA utilizando o kit de detecção *VIEW DAB Detection Kit* ou *ultraView Universal DAB Detection Kit*:

Reprodutibilidade de coloração inter-laboratorial e inter-dia com o instrumento BenchMark ULTRA: Três laboratórios, de instituições separadas nos Estados Unidos, participaram no estudo de reprodutibilidade inter-laboratorial. Foram distribuídas lâminas de cortes de 48 casos de carcinomas da mama invasivos FFPE [12 de cada categoria de colocação em lote de HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] e 1 par de lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1 por cada 12 processos de coloração nos locais de estudo para se proceder à coloração num dispositivo automático de coloração VENTANA BenchMark ULTRA, utilizando o protocolo de coloração recomendado e o kit de detecção *ultraView Universal DAB Detection Kit*. Os controlos incluídos nas lâminas PATHWAY HER-2 4 em 1 e uma segunda lâmina de cada caso apresentaram coloração com reagente negativo para Ig. Os patologistas, desconhecendo o estado do caso, avaliaram as lâminas e forneceram uma pontuação clínica (ou seja, 0, 1+, 2+, 3+). Os resultados foram analisados pela Ventana. Utilizando a nomenclatura padrão para tabelas 2x2, a concordância positiva média (APA) foi calculada em todos os locais como $[2a/(2a+b+c)]$ e a concordância negativa média (ANA) foi calculada como $[2d/(2d+b+c)]$. Em todos os locais, a APA inter-local baseada na avaliação clínica (positiva, negativa) foi de 90,0% (108/120) e a ANA de 92,9% (156/168). Para comparações emparelhadas de locais, a APA foi calculada como $a/(a+c)$ e a ANA foi calculada como $d/(b+d)$. As taxas de APA inter-local foram de 93,0% (40/43), 87,2% (34/39) e 89,5% (34/38) para o Local A vs. Local B, Local A vs. Local C e Local B vs. Local C, respectivamente. As taxas de ANA inter-local foram de 94,3% (50/53), 91,2% (52/57) e 93,1% (54/58) para o Local A vs. Local B, Local A vs. Local C e Local B vs. Local C, respectivamente.

As tabelas seguintes são apresentações 3x3 dos resultados de cada leitor baseadas numa pontuação clínica em que 2+ e 3+ foram separados.

Tabela 17. Análise 3x3 das Taxas de Concordância Inter-laboratorial do Local A vs. Local B – clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA com o *ultraView Universal DAB Detection Kit*.

Local A	Local B			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8
0, 1+	0	1	25	26
Total	12	9	27	48
Percentagem de concordância global (OPA): n/N (%)				43/48 (89,6)

Tabela 18. Análise 3x3 das taxas de concordância inter-laboratorial do Local A vs. Local C – clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA com o *ultraView Universal DAB Detection Kit*.

Local A	Local C			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	12	1	1	14
2+	0	4	4	8
0, 1+	0	0	26	26
Total	12	5	31	48
Percentagem de concordância global (OPA): n/N (%)				42/48 (87,5)

Tabela 19. Análise 3x3 das taxas de concordância inter-laboratorial do Local B vs. Local C – clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA com o *ultraView Universal DAB Detection Kit*.

Local B	Local C			
	3+	2+	0, 1+	Total
3+	12	0	0	12
2+	0	5	4	9
0, 1+	0	0	27	27
Total	12	5	31	48
Percentagem de concordância global (OPA): n/N (%)				44/48 (91,7)

10. BenchMark ULTRA Reprodutibilidade da coloração inter-dia com o instrumento:

A porção de reprodutibilidade inter-dia (IDR) do estudo incluiu 12 casos com uma distribuição prevista de aproximadamente três (3) casos para cada pontuação clínica (0, 1+, 2+, 3+). No total, os cinco ensaios no instrumento BenchMark ULTRA numa única instituição (Local C) sobre a porção de IDR do estudo foram realizados durante um período mínimo de 20 dias, de forma a que não ocorressem dois dias de coloração consecutivos. As taxas de APA e ANA de IDR baseadas na avaliação clínica da coloração do clone 4B5 no Local C durante todos os dias foram ambas de 100%. As taxas de percentagem de concordância global (OPA) para as comparações inter-dia baseadas nas pontuações clínicas foram de 100% para cada uma das comparações dia-a-dia e para todos os dias combinados.

11. Estudo comparativo entre a plataforma de coloração BenchMark ULTRA e as plataformas de coloração BenchMark XT:

Dois laboratórios de coloração e três locais de leitura nos Estados Unidos participaram no estudo comparativo de plataformas. Foram aleatoriamente distribuídas lâminas de cortes de 280 casos de carcinomas da mama invasivos FFPE [aproximadamente 70 casos por cada categoria de colocação em lote de HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] em dois locais de coloração (140 casos para cada local) para se proceder à coloração num instrumento BenchMark XT e num instrumento BenchMark ULTRA utilizando os respectivos protocolos de coloração recomendados e o kit de detecção *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Os controlos incluídos nas lâminas PATHWAY HER-2 4 em 1 e uma segunda lâmina de cada caso apresentaram coloração com reagente negativo para Ig. Os casos corados do Local 1 e Local 2 foram divididos em quatro conjuntos de lâminas e fornecidos, um conjunto de cada vez, a três leitores qualificados diferentes (patologistas), um leitor no Local 1, um no Local 2 e um no Local 3. Os patologistas, desconhecendo o estado do caso e plataforma de coloração, avaliaram os quatro conjuntos de lâminas e facultaram uma pontuação clínica (ou seja, 0, 1+, 2+, 3+) para cada caso. Os resultados foram analisados pela Ventana. As taxas de PPA (e de ligação inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95%) para a coloração do anticorpo do clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA versus o instrumento BenchMark XT baseadas na avaliação clínica (positiva, negativa) foram de 91,6% (85,9), 91,2% (85,3) e 94,9% (89,3) para o Leitor A, B e C, respectivamente. As taxas de NPA (e de ligação inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95%) para a coloração do anticorpo do clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA versus o instrumento BenchMark XT baseadas na avaliação clínica (positiva, negativa) foram de 91,9% (85,8), 93,8% (88,3) e 99,3% (96,3) para o Leitor A, B e C, respectivamente. A OPA entre a coloração do clone 4B5 utilizando o instrumento BenchMark ULTRA versus o instrumento BenchMark XT baseada na análise 2x2 de avaliação clínica (positiva, negativa) foi de 91,8%, 92,5% e 97,4% para o Leitor A, B e C, respectivamente. A apresentação 3x3 das taxas de concordância inter-plataforma para cada leitor baseadas na pontuação clínica (0/1+, 2+, 3+) é indicada nas tabelas abaixo:

Tabela 20. Análise 3x3 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – Leitor A.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT			
Leitor A	3+	2+	0, 1+	Total
3+	84	11	1	96
2+	8	28	9	45
0, 1+	4	8	114	126
Total	96	47	124	267
Percentagem de concordância global: n/N 226/267 (84,6) (79,8-88,5) (%) (IC de 95%)				

Tabela 21. Análise 3x3 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – Leitor B.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT			
Leitor B	3+	2+	0, 1+	Total
3+	64	2	1	67
2+	3	56	7	66
0, 1+	2	10	122	134
Total	69	68	130	267
Percentagem de concordância global: n/N 242/267 (90,6) (86,5-93,6) (%) (IC de 95%)				

Tabela 22. Análise 3x3 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark ULTRA vs. BenchMark XT – Leitor C.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT			
Leitor C	3+	2+	0, 1+	Total
3+	64	1	0	65
2+	2	45	1	48
0, 1+	0	6	148	154
Total	66	52	149	267
Percentagem de concordância global: n/N 257/267 (96,3) (93,2-98,0) (%) (IC de 95%)				

12. Reprodutibilidade inter-patologista das amostras dos estudos comparativos de plataforma:

As taxas de concordância positiva e negativa com intervalos de confiança de 95% de pontuação bilateral foram calculadas para as seis comparações emparelhadas possíveis entre leitores para cada plataforma.

Para o instrumento BenchMark ULTRA, as taxas de PPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 94,7% (126/133), 98,2% (111/113), 98,2% (111/113), 89,4% (126/141), 78,7% (111/141) e 83,5% (111/133), respectivamente. As taxas de NPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 88,8% (119/134), 80,5% (124/154), 85,7% (132/154), 94,4% (119/126), 98,4% (124/126) e 98,5% (132/134), respectivamente. A taxa de OPA foi superior entre o Leitor A e o Leitor B (91,8%) e inferior entre o Leitor B e o Leitor C (91,0%) e entre o Leitor A e o Leitor C (88,8%).

Para o instrumento BenchMark XT, as taxas de PPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 94,9% (130/137), 98,3% (116/118), 98,3% (116/118), 90,9% (130/143), 81,1% (116/143) e 84,7% (116/137), respectivamente. As taxas de NPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 90,0% (117/130), 81,9% (122/149), 85,9% (128/149), 94,4% (117/124), 98,4% (122/124) e 98,5% (128/130), respectivamente. A taxa de OPA foi superior entre o Leitor A e o Leitor B (92,5%) e inferior entre o Leitor B e o Leitor C (91,4%) e entre o Leitor A e o Leitor C (89,1%).

13. Estudo de comparação entre o kit de detecção *VIEW* DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit:

O grupo do Local 1 com 140 casos de carcinomas da mama invasivos FFPE [aproximadamente 35 casos por cada categoria de colocação em lote de HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] foi utilizado num estudo comparativo entre os kits de detecção *VIEW* DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit durante a coloração com o clone 4B5 num dispositivo automático de coloração BenchMark ULTRA. Um único laboratório de coloração e três locais de leitura nos Estados Unidos participaram no estudo comparativo de detecção. Na coloração do anticorpo do clone 4B5 com o instrumento BenchMark ULTRA, as taxas de PPA entre resultados obtidas através dos métodos com o *VIEW* DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit baseadas na avaliação clínica (positiva, negativa) foram de 95,8% (68/71), 96,9% (63/65) e 96,5% (55/57) para os Leitores A, B e C, respectivamente, e as taxas de NPA entre os métodos de detecção foram de 90,8% (59/65), 91,5% (65/71) e 97,5% (77/79) para os Leitores A, B e C, respectivamente. As taxas de OPA entre os kits de detecção foram de 93,4% (127/136), 94,1% (128/136) e 97,1% (132/136) para os Leitores A, B e C, respectivamente. A apresentação 3x3 das taxas de concordância comparativa de detecção para cada leitor baseadas na pontuação clínica (0/1+, 2+, 3+) é indicada nas tabelas abaixo:

Tabela 23. Leitor A, Análise 3x3 das taxas de concordância do /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – coloração do clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leitor A	3+	2+	0, 1+	Total
3+	43	5	0	48
2+	3	17	6	26
0, 1+	0	3	59	62
Total	46	25	65	136
Percentagem de concordância global: n/N (%) (IC de 95%)			119/136 (87,5) (80,9-92,0)	

Tabela 24. Leitor B, Análise 3x3 das taxas de concordância do /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – coloração do clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leitor B	3+	2+	0, 1+	Total
3+	32	0	0	32
2+	0	31	6	37
0, 1+	1	1	65	67
Total	33	32	71	136
Percentagem de concordância global: n/N (%) (IC de 95%)			128/136 (94,1) (88,8-97,0)	

Tabela 25. Leitor C, Análise 3x3 das taxas de concordância do /VIEW DAB Detection Kit vs. *ultraView* Universal DAB Detection Kit – coloração do clone 4B5 no instrumento BenchMark ULTRA.

/VIEW DAB Detection Kit	<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Leitor C	3+	2+	0, 1+	Total
3+	32	0	0	32
2+	0	23	2	25
0, 1+	0	2	77	79
Total	32	25	79	136
Percentagem de concordância global: n/N (%) (IC de 95%)			132/136 (97,1) (92,7-98,9)	

14. Reprodutibilidade inter-patologista das amostras dos estudos comparativos de detecção:

Calcularam-se as taxas de concordância positiva e negativa com intervalos de confiança de 95% bilaterais para as seis comparações emparelhadas possíveis entre leitores para cada método.

No /VIEW DAB Detection Kit, as taxas de PPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 100,0% (69/69), 98,2% (56/57), 96,5% (55/57), 93,2% (69/74), 75,7% (56/74) e 79,7% (55/69), respectivamente. As taxas de NPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 92,5% (62/67), 77,2% (61/79), 82,3% (65/79), 100,0% (62/62), 98,4% (61/62) e 97,0% (65/67), respectivamente. A taxa de concordância global foi superior entre o Leitor A e o Leitor B (96,3%) e inferior entre o Leitor A e o Leitor C (86,0%) e entre o Leitor B e o Leitor C (88,2%).

No *ultraView* Universal DAB Detection Kit, as taxas de PPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 96,9% (63/65), 98,2% (56/57), 98,2% (56/57), 88,7% (63/71), 78,9% (56/71) e 86,2% (56/65), respectivamente. As taxas de NPA para o Leitor A vs. B, A vs. C, B vs. C, B vs. A, C vs. A e C vs. B foram de 88,7% (63/71), 81,0% (64/79), 88,6% (70/79), 96,9% (63/65), 98,5% (64/65) e 98,6% (70/71), respectivamente. As taxas de concordância global foram semelhantes para cada par de leitores: 92,6% (126/136), 88,2% (120/136) e 92,6% (126/136) para o Leitor A vs. B, o Leitor A vs. C e o Leitor B vs. C, respectivamente.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO NOS CASOS GÁSTRICOS

1. A repetibilidade inter-ensaio no instrumento BenchMark XT foi efectuada em cinco ensaios realizados durante um período de 5 dias (não consecutivos). Cinco lâminas contendo três casos de tecido gástrico com pontuações relativas à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+ demonstraram 100% de concordância dentro do valor positivo/negativo para cada tecido.

2. A repetibilidade intra-ensaio no instrumento BenchMark XT foi efectuada em 28 lâminas contendo três casos de tecido gástrico com pontuações relativas à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+. Todos os casos obtiveram pontuações equivalentes dentro do valor positivo/negativo para cada tipo de tecido.

A repetibilidade intra-plataforma foi efectuada em três instrumentos BenchMark XT. Nestes ensaios, todas as 30 lâminas de dois blocos diferentes com vários tecidos apresentando pontuações relativas à expressão de HER2 de 0, 1+, 2+ e 3+ obtiveram pontuações equivalentes dentro do valor positivo/negativo para cada tipo de tecido.

A repetibilidade intra-plataforma foi testada em três instrumentos BenchMark ULTRA. Nestes ensaios, todas as 15 lâminas de um bloco com vários tecidos obtiveram pontuações equivalentes dentro do valor positivo/negativo para cada tipo de tecido.

A repetibilidade inter-plataforma foi testada em três instrumentos BenchMark XT e em três instrumentos BenchMark ULTRA. Nestes ensaios, todas as 30 lâminas de um bloco com vários tecidos obtiveram pontuações equivalentes dentro do valor positivo/negativo para cada tipo de tecido.

3. Comparação entre os kits de detecção /VIEW DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit utilizando casos gástricos:

O clone 4B5 foi utilizado para efectuar testes comparativos entre kits de detecção com dois instrumentos (instrumento BenchMark XT e instrumento BenchMark ULTRA), utilizando os kits de detecção /VIEW DAB Detection Kit e *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Foram utilizados duzentos e dez casos de tecido como parte dos testes. As lâminas coradas foram avaliadas relativamente à pontuação clínica positiva/negativa.

As taxas de aceitação morfológica e de fundo foram de 100% para ambos os kits de detecção e instrumentos. As comparações directas entre a avaliação positiva e negativa dos kits de detecção para cada instrumento são apresentadas nas tabelas seguintes.

Tabela 26. Avaliação clínica para *ultraView* Universal DAB Detection Kit versus /VIEW DAB Detection Kit no instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	/VIEW DAB Detection Kit		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	21	0	21
Negativo	0	189	189
Total	21	189	210
	n/N	%	
Percentagem de concordância positiva	21/21	100	
Percentagem de concordância negativa	189/189	100	
Percentagem de concordância global	210/210	100	

Tabela 27. Comparação da avaliação clínica nas plataformas de coloração BenchMark XT e BenchMark ULTRA utilizando o *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

BenchMark XT com <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	BenchMark ULTRA com <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	20	1	21
Negativo	0	189	189
Total	20	190	210
	n/N	% (IC de 95%)	
Percentagem de concordância positiva	20/20	100 (83.9-100)	
Percentagem de concordância negativa	189/190	99.5 (97.1-99.9)	
Percentagem de concordância global	209/210	99.5 (97.4-99.9)	

4. Comparação entre o clone 4B5 e HercepTest no cancro gástrico humano: Foi realizado um estudo externo, com ocultação, para comparar o desempenho da coloração do clone 4B5 no instrumento BenchMark XT com o do Dako HercepTest. Foram testados aproximadamente 239 casos de cancro gástrico no estudo, bem como 159 casos do laboratório TARGOS, provenientes do ensaio ToGA que investigou o estado de HER2 e o resultado clínico em doentes tratados com Herceptin. O laboratório procedeu à coloração de casos com o clone 4B5 e HercepTest. Um patologista pontuou os casos numa escala de 0/1+, 2+ e 3+. Os casos positivos consistem nas pontuações de 2+ e 3+, enquanto os casos negativos consistem nas de 0 e 1+.
- As Tabelas 28 e 29 incluem as taxas de concordância entre o clone 4B5 e HercepTest, divididas por origem do tecido. A Tabela 28 compara os resultados positivos vs. negativos, enquanto a Tabela 29 utiliza uma escala de IHC com 3 categorias de 0/1+, 2+ e 3+. A concordância global para todos os tecidos nas Tabelas 28 e 29 é de 91,0% e 95,3%, respectivamente.

Tabela 28. Taxas de percentagem de concordância e intervalo de confiança de 95% para o clone 4B5 (IHC) vs. HercepTest, divididas por origem do tecido. Ambos os testes de IHC foram pontuados como positivos vs. negativos (0/1+ vs 2+/3+).

n	Percentagem de concordância global (IC de 95%)	n	Percentagem de concordância positiva (IC de 95%)	n	Percentagem de concordância negativa (IC de 95%)
362/398	91,0 (87,7-93,4)	46/56	82,1 (70,2-90,0)	316/342	92,4 (89,1-94,8)

Tabela 29. Percentagem de concordância global e intervalo de confiança de 95% para o clone 4B5 (IHC) vs. HercepTest, divididas por origem do tecido. Os testes de IHC foram pontuados como 0/1+, 2+ ou 3+.

Origem do tecido	n	Percentagem de concordância global (IC de 95%)
TMA e ToGA	355/398	89,2 (85,8-91,9)

5. Reprodutibilidade inter-laboratorial do clone 4B5: O estudo foi realizado em três locais de teste. As amostras para inclusão no estudo foram seleccionadas com base na pontuação clínica de IHC do clone 4B5, de forma a existir um número aproximadamente igual de casos positivos (3+) e negativos (0, 1+). Adicionalmente, foram estudados até quatro casos de cancro gástrico qualificado como 2+.

Os três locais utilizaram uma plataforma BenchMark XT e uma plataforma BenchMark ULTRA para efectuar os quatro ensaios de coloração por plataforma. Os casos foram aleatoriamente distribuídos para coloração utilizando um procedimento de distribuição aleatória estratificado, que atribuiu os casos de forma a que cada ensaio contivesse casos representativos de todas as categorias de pontuação para HER2 no cancro gástrico. Os ensaios com cada instrumento em cada local contiveram os mesmos casos. Em cada local, uma lâmina de cada caso foi corada com o clone 4B5 e outra lâmina do mesmo caso com CONFIRM Negative Control Rabbit Ig na plataforma BenchMark ULTRA. Um segundo par de lâminas do mesmo caso foi identicamente corado na plataforma BenchMark XT em cada local. As lâminas de caso foram pontuadas por um leitor qualificado em cada local, desconhecendo as pontuações IHC anteriormente determinadas para cada amostra. A concordância global para todos os casos passíveis de avaliação foi de 100% para todas as comparações entre os três locais com ambas as plataformas BenchMark ULTRA e BenchMark XT. A concordância global entre a plataforma BenchMark ULTRA e a plataforma BenchMark XT para os casos passíveis de avaliação foi de 100% em cada um dos três locais. As taxas de aceitação de fundo e morfológica para todos os casos foram de 100% para ambas as plataformas nos Locais A e C e >95% para ambas as plataformas no Local B. Consultar as tabelas abaixo.

Tabela 30. Concordância da avaliação clínica global entre locais: Todos os casos passíveis de avaliação.

Instrumento BenchMark ULTRA	Percentagem de concordância global
Local A vs Local B: n/N (%) (IC de 95%)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
Local A vs Local C: n/N (%) (IC de 95%)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
Local B vs Local C: n/N (%) (IC de 95%)	30/30 (100%) (88,6 – 100)
Instrumento BenchMark XT	Percentagem de concordância global
Local A vs Local B: n/N (%) (IC de 95%)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
Local A vs Local C: n/N (%) (IC de 95%)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)
Local B vs Local C: n/N (%) (IC de 95%)	31/31 (100%) (89,0 – 100,0)

Tabela 31. Concordância da avaliação clínica global entre plataformas: Todos os casos passíveis de avaliação.

Instrumento BenchMark ULTRA vs instrumento BenchMark XT	Percentagem de concordância global
Local A: n/N (%) (IC de 95%)	40/40 (100%) (91,2 – 100)
Local B: n/N (%) (IC de 95%)	34/34 (100%) (89,8 – 100)
Local C: n/N (%) (IC de 95%)	32/32 (100%) (89,3 – 100)

Tabela 32. Taxas de aceitação de coloração de fundo e morfológica: Todos os casos.

Instrumento BenchMark ULTRA	Local A	Local B	Local C
Taxas de aceitação morfológica	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Taxas de aceitação de fundo	44/44 (100%)	42/44 (95,5%)	44/44 (100%)
Instrumento BenchMark XT	Local A	Local B	Local C
Taxas de aceitação morfológica	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)
Taxas de aceitação de fundo	44/44 (100%)	43/44 (97,7%)	44/44 (100%)

6. Estudo comparativo entre as plataformas de coloração BenchMark e BenchMark GX e a plataforma de coloração BenchMark XT:

Foram coradas lâminas de cortes de 3 TMAs contendo casos de carcinoma gástrico FFPE [aproximadamente 50 casos por TMA] num instrumento BenchMark XT, num instrumento BenchMark e num instrumento BenchMark GX utilizando os respectivos protocolos de coloração recomendados para os kits de detecção *ultraView* Universal DAB Detection Kit e *VIEW* DAB Detection Kit. Os controlos incluíram as lâminas de controlo PATHWAY HER-2 4 em 1 e uma segunda lâmina de cada TMA corada com reagente negativo para Ig. As lâminas coradas foram pontuadas por um leitor (patologista).

As taxas de concordância global (e de ligação inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95%) para a coloração do anticorpo do clone 4B5 baseadas numa avaliação clínica (positiva, negativa) foram as seguintes: Instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,0% (94,2-99,3), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 97,4% (93,6-99,0), instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 96,6% (92,7-98,4), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 95,9% (91,8-98,0).

As taxas de concordância positiva (e de ligação inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95%) para a coloração do anticorpo do clone 4B5 baseadas numa avaliação clínica (positiva, negativa) foram as seguintes: Instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 91,7% (64,4-98,5), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 78,6% (52,4-92,4), instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 80,0% (54,8-93,0), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 73,3% (48,0-89,1).

As taxas de concordância negativa (e de ligação inferior dos intervalos de confiança bilaterais de 95%) para a coloração do clone 4B5 baseadas numa avaliação clínica (positiva, negativa) foram as seguintes: Instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 98,5% (94,8-99,6), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *ultraView* Universal DAB Detection Kit 99,3% (96,1-99,9), instrumento BenchMark versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 98,1% (94,6-99,4), instrumento BenchMark GX versus instrumento BenchMark XT com *VIEW* DAB Detection Kit 98,1% (94,5-99,3). A apresentação 2x2 das taxas de concordância para cada comparação baseadas na avaliação clínica (positiva, negativa) é incluída nas tabelas abaixo.

Tabela 33. Análise 2x2 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark vs. instrumento BenchMark XT com o *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Clone 4B5 com <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark	Instrumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	2	13
Negativo	1	133	134
Total	12	135	147
	n/N	% (IC de 95%)	
Percentagem de concordância global	144/147	98,0% (94,2-99,3)	
Percentagem de concordância positiva	11/12	91,7% (64,6-98,5)	
Percentagem de concordância negativa	133/135	98,5% (94,8-99,6)	

Tabela 34. Análise 2x2 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark GX vs. instrumento BenchMark XT com o *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Clone 4B5 com <i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit			
BenchMark GX Instrumento	Instrumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	1	12
Negativo	3	140	143
Total	14	141	155
	n/N	% (IC de 95%)	
Percentagem de concordância global	151/155	97,4% (93,6-99,0)	
Percentagem de concordância positiva	11/14	78,6% (52,4-92,4)	
Percentagem de concordância negativa	140/141	99,3% (96,1-99,9)	

Tabela 35. Análise 2x2 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark vs. instrumento BenchMark XT com o *VIEW* DAB Detection Kit.

Clone 4B5 com <i>VIEW</i> DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark	Instrumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	12	3	15
Negativo	3	156	159
Total	15	159	174
	n/N	% (IC de 95%)	
Percentagem de concordância global	168/174	96,6% (92,7-98,4)	
Percentagem de concordância positiva	12/15	80,0% (54,8-93,0)	
Percentagem de concordância negativa	156/159	98,1% (94,6-99,4)	

Tabela 36. Análise 2x2 das taxas de concordância inter-plataforma do instrumento BenchMark GX vs. instrumento BenchMark XT com o VIEW DAB Detection Kit.

Clone 4B5 com VIEW DAB Detection Kit			
Instrumento BenchMark GX	Instrumento BenchMark XT		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11	3	14
Negativo	4	154	158
Total	15	157	172
	n/N	% (IC de 95%)	
Percentagem de concordância global	165/172	95,9% (91,8-98,0)	
Percentagem de concordância positiva	11/15	73,3% (48,0-89,1)	
Percentagem de concordância negativa	154/157	98,1% (94,5-99,3)	

Conclusão: Os dados destes estudos indicam que o VENTANA HER2 (4B5) era específico e reprodutível em termos da sua capacidade de corar apropriadamente os tecidos neoplásicos da mama e gástricos. Os dados de comparação dos métodos e de reprodutibilidade inter-laboratorial demonstraram que o VENTANA HER2 (4B5) é indicado como um auxiliar da avaliação de doentes com cancro da mama e gástrico para os quais se considera o tratamento com Herceptin.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO – PERJETA E KADCYLA

HER2 na mama - Estudo comparativo de métodos com o ensaio de inscrição dos estudos de Perjeta e Kadcyla no carcinoma da mama

Foi determinada a equivalência com ensaios de inscrição para grupos dos estudos de Perjeta e Kadcyla através da coloração de amostras experimentais com o ensaio VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Foi efectuada a coloração de 2753 amostras avaliadas para um ensaio de Perjeta e 99 amostras avaliadas para um ensaio de Kadcyla com VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5)). *Foram determinadas as taxas de concordância de percentagem positiva (PPA), negativa (NPA) e global (OPA).* O IC de 95% (intervalo de confiança de 95% bilateral) foi calculado utilizando o método de pontuação.

Tabela 37. Concordância do ensaio Clone 4B5 e de ensaios Dako relativamente ao estado de HER2 para todos os sujeitos passíveis de avaliação de HER2. Os sujeitos passíveis de avaliação IHC apresentam um estado de HER2 positivo ou negativo determinado pelo ensaio Clone 4B5 e pelo ensaio IHC na inscrição.

Estudo	Pontuação Clone 4B5 [b]	Estado DAKO HER2 [a] [b]		
		Positivo	Negativo	Total
Perjeta e Kadcyla	3+	2380	15	2395
	2+	140	122	262
	0/1+	38	135	173
	Total	2558	272	2830
Percentagem de concordância positiva (PPA) n/N (%) (IC de 95%)		2380/2558 (93,0) (92,0-94,0)		
Percentagem de concordância negativa (NPA) n/N (%) (IC de 95%)		257/272 (94,5) (91,1-96,6)		
Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)		2637/2830 (93,2) (92,2-94,1)		

[a] Positivo = positivo para IHC e/ou amplificação por ISH. Negativo = negativo para IHC e sem amplificação por ISH ou sem amplificação por ISH e não positivo para IHC.

[b] IHC: Positivo = 3+; Negativo = 0, 1+, ou 2+.

Tabela 38. Concordância do ensaio Clone 4B5 e de ensaios Dako relativamente ao estado de IHC para todos os sujeitos passíveis de avaliação de IHC. Os sujeitos passíveis de avaliação IHC apresentam um estado de HER2 positivo ou negativo determinado pelo ensaio Clone 4B5 e pelo ensaio IHC na inscrição.

Estudo	Estado Clone 4B5 [a]	Estado Dako HercepTest [a]		
		Positivo	Negativo	Total
Perjeta e Kadcylla	Positivo	2330	65	2395
	Negativo	21	414	435
	Total	2351	479	2830
	Percentagem de concordância positiva (PPA) n/N (%) (IC de 95%)	2330/2351 (99,1) (98,6-99,4)		
	Percentagem de concordância negativa (NPA) n/N (%) (IC de 95%)	414/479 (86,4) (83,1-89,2)		
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)	2744/2830 (97,0) (96,3-97,5)		
Perjeta	Positivo	2267	63	2330
	Negativo	10	399	409
	Total	2277	462	2739
	Percentagem de concordância positiva (PPA) n/N (%) (IC de 95%)	2267/2277 (99,6) (99,2-99,8)		
	Percentagem de concordância negativa (NPA) n/N (%) (IC de 95%)	399/462 (86,4) (82,9-89,2)		
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)	2666/2739 (97,3) (96,7-97,9)		
Kadcylla	Positivo	63	2	65
	Negativo	11	15	26
	Total	74	17	91
	Percentagem de concordância positiva (PPA) n/N (%) (IC de 95%)	63/74 (85,1) (75,3-91,5)		
	Percentagem de concordância negativa (NPA) n/N (%) (IC de 95%)	15/17 (88,2) (65,7-96,7)		
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)	78/91 (85,7) (77,1-91,5)		

[a] Positivo = 3+; Negativo = 0, 1+, ou 2+.

Tabela 39. Concordância dos ensaios Clone 4B5 e de ensaios Dako relativamente à pontuação de IHC para todos os sujeitos passíveis de avaliação de IHC. Os sujeitos passíveis de avaliação IHC apresentam um estado de HER2 positivo ou negativo determinado pelo ensaio Clone 4B5 e pelo ensaio IHC na inscrição.

Estudo	Pontuação do Clone 4B5 (4B5)	Pontuação Dako HercepTest			Total
		3+	2+	0/1+	
Perjeta e Kadcylla	3+	2330	64	1	2395
	2+	12	235	15	262
	0/1+	9	26	138	173
	Total	2351	325	154	2830
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 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
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)	2629/2739 (96,0) (95,2-96,7)			
Kadcylla	3+	63	2	0	65
	2+	3	9	2	14
	0/1+	8	2	2	12
	Total	74	13	4	91
	Percentagem de concordância global (OPA) n/N (%) (IC de 95%)	74/91 (81,3) (72,1-88,0)			

Tabela 40. Aceitabilidade de coloração do Clone 4B5. Sujeitos testados por IHC. A coloração IHC é considerada aceitável se for possível determinar uma pontuação IHC válida (0, 1+, 2+ ou 3+). As razões para coloração inaceitável incluem um controlo negativo inaceitável, perda de tecido, tumor insuficiente, coloração de fundo inaceitável e morfologia inaceitável.

Parâmetro	Perjeta	Kadcyla	Perjeta e Kadcyla
Número de testes IHC iniciais	2753	99	2852
Aceitabilidade da coloração inicial n/N (%) (IC de 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)
Número de testes IHC repetidos	40	0	40
Aceitabilidade da coloração final n/N (%) (IC de 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)

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

- Se o controlo positivo apresentar uma coloração mais fraca que a esperada, deverão verificar-se os restantes controlos positivos processados durante o mesmo ensaio no instrumento em questão, para determinar se tal situação foi causada pelo anticorpo primário ou por um dos reagentes secundários comuns.
- Se o controlo positivo apresentar um resultado negativo, deve verificar-se se a lâmina possui a etiqueta de código de barras correcta. Se a lâmina tiver a etiqueta correcta, deverão verificar-se os restantes controlos positivos processados durante o mesmo ensaio no dispositivo em questão, para determinar se tal situação foi causada pelo anticorpo primário ou por um dos reagentes secundários normais. Os tecidos poderão ter sido colhidos, fixados ou desparafinados incorrectamente. Deverá seguir-se o procedimento correcto para a colheita, conservação e fixação.
- Se a totalidade da parafina não tiver sido retirada, poderá não ocorrer coloração. O procedimento de desparafinação deverá ser repetido.
- Se a coloração específica dos anticorpos for demasiado intensa, deverá repetir-se o ensaio reduzindo o tempo de incubação até que seja atingida a intensidade de coloração pretendida.
- Se as secções de tecido desaparecerem (forem "varridas") da lâmina, as lâminas deverão ser verificadas para garantir que se encontram carregadas positivamente.
- Se a coloração nuclear e citoplasmática estiverem presentes na mucosa normal nas proximidades da área do tumor no carcinoma gástrico e confundirem a interpretação da coloração da membrana, o caso pode ser testado por ISH.
- Para acções correctivas, consultar a secção de Procedimento detalhado no Manual do Operador do instrumento ou contactar o representante de assistência local.

REFERÊNCIAS

- Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232: 1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO*. 1987; 6: 605-610.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17: 234-247.
- Herceptin (Trastuzumab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
- Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 1994;69: 57-58.
- Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. *Br J Cancer*. 1997;75: 667-1673.
- Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 1990;161:15-25.
- Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. *Eur J Cancer*. 1993;29A:1018-1023.
- DePotter CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- 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.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
- CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
- Hoffmann M, et al. *Histopathology*. 2008;52:797-805.
- 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.
- Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66(4):194-199.
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1980;73(5):626-32.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
- 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.
- Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol*. 1994;47:816-22.
- 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.
- Rhodes A, Sarson J, et al. The reliability of rabbit monoclonal antibodies in the immunohistochemical assessment of estrogen receptors, progesterone receptors, and HER2 in human breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(4): 621-32.
- van der Vegt B, de Bock GH, Bart J, Zwartjes NG, Wesseling J. Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining HER2 status in breast cancer. *Mod Pathol*. 2009;22(7):879-886.
- Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her-2/neu Test 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Virchows Arch*. 2009;454(3):241-8 (Epub: 24 Jan 2009).
- Itoh H, Kato N, Serizawa A, Itoh T, Umemura S, Osamura RY. HER2 Rabbit Monoclonal Antibody 4B5 and Silver SISH: High Performance in Surgical Pathology for Appropriate Patient Care. *Laboratory Investigation*. 2009;89(1): 48A.

28. Powell WC, Roche PC, Tubbs RR. A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(6):569.
29. Carbone A, Botti G, et al. Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn*. 2008;10(6): 527-36.
30. Wolff AC, Hammond ME, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18.
31. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
32. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):461-71.
33. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
34. <http://www.kadcyla.com/hcp>
35. <http://www.perjeta.com/hcp>

PROPRIEDADE INTELECTUAL

BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView*, PATHWAY, VENTANA e o logótipo VENTANA são marcas comerciais da Roche.

Todas as restantes marcas comerciais são propriedade dos respectivos titulares.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMAÇÃO PARA CONTACTO



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany



www.ventana.com