

# Bond™ Oracle™ HER2 IHC System

## Instrucciones de uso

Para uso en el sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado Leica Biosystems BOND.

El Product Code TA9145 está diseñado para 60 pruebas de tinción (150 portaobjetos):

60 portaobjetos de prueba con HER2 Primary Antibody

60 portaobjetos de prueba con HER2 Negative Control

15 portaobjetos de control HER2 con HER2 Primary Antibody

15 controles positivos internos de tejido con HER2 Primary Antibody



Leica Biosystems Newcastle Ltd  
Balliol Business Park West  
Berton Lane  
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW  
United Kingdom  
☎ +44 191 215 4242



Leica Biosystems Canada  
71 Four Valley Drive  
Concord, Ontario L4K 4V8  
Canada  
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc  
1700 Leider Lane  
Buffalo Grove IL 60089  
USA  
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne  
Pty Ltd  
495 Blackburn Road  
Mt Waverley VIC 3149  
Australia  
☎ +61 2 8870 3500

# Contenido

<b>Uso previsto</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumen y explicación</b> .....	<b>4</b>
Introducción.....	4
Expresión de HER2.....	5
Resumen de concordancia clínica.....	5
<b>Principio de procedimiento</b> .....	<b>5</b>
Componentes suministrados.....	5
Instrucciones de uso.....	6
Almacenamiento y estabilidad.....	6
Preparación de muestras.....	6
Advertencias y precauciones.....	7
<b>Procedimiento</b> .....	<b>7</b>
A. Reactivos necesarios no suministrados.....	7
B. Equipo necesario no suministrado.....	8
C. Metodología.....	8
D. Disposición de portaobjetos.....	8
E. Procedimiento detallado.....	9
<b>Control de calidad</b> .....	<b>11</b>
HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody.....	12
Tejido de control positivo interno – HER2 Primary Antibody.....	12
Componente tisular de control negativo interno - HER2 Primary Antibody.....	13
Tejido de paciente – HER2 Negative Control.....	13
Tejido de paciente – HER2 Primary Antibody.....	13
Verificación del análisis.....	13
Interpretación de la tinción - Mama.....	14
Interpretación de la tinción - Estómago.....	14
<b>Lógica del orden de screening de portaobjetos</b> .....	<b>15</b>
1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody.....	15
2. Tejido de control positivo interno – HER2 Primary Antibody.....	16
3. Componente tisular de control negativo interno – HER2 Positive Control.....	16
4. Tejido de paciente – teñido usando el HER2 Negative Control.....	16
5. Tejido de paciente – teñido usando el HER2 Primary Antibody.....	16
<b>Limitaciones</b> .....	<b>16</b>
A. Limitaciones generales.....	16
B. Limitaciones específicas del producto.....	17
<b>Datos de la línea celular</b> .....	<b>18</b>
<b>Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System vs. Dako HercepTest- Mama</b> .....	<b>18</b>
Resultados de concordancia 2x2.....	19
Resultados de concordancia 3x3.....	20
<b>Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System vs. PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama</b> .....	<b>20</b>
Resultados de concordancia 3x2.....	21
<b>Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Estómago</b> .....	<b>21</b>
<b>Resultados - Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Estómago</b> .....	<b>22</b>
Resultados de concordancia 2x2.....	22
Resultados de concordancia 3x3.....	23
<b>Inmunorreactividad – Panel normal</b> .....	<b>24</b>

<b>Estudio de reproducibilidad</b> .....	<b>25</b>
Prueba de precisión intraciclo e interciclo .....	25
A. Prueba de precisión intraciclo .....	25
B. Prueba de precisión interciclo .....	25
C. Reproducibilidad entre lotes .....	26
D. Reproducibilidad entre laboratorios .....	26
E. Reproducibilidad entre observadores .....	27
F. Precisión entre instrumentos (BOND-MAX vs. BOND-III) .....	27
<b>Solución de problemas</b> .....	<b>29</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>31</b>

## Uso previsto

### Para uso diagnóstico in vitro

El Bond Oracle HER2 IHC System es un sistema de análisis inmunohistoquímico (IHC) semicuantitativo para la determinación del estado de la oncoproteína HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) en tejido de cáncer mamario y adenocarcinomas del estómago (incluyendo la unión gastroesofágica) procesado para evaluación histológica. El Bond Oracle HER2 IHC System está indicado como una ayuda para la evaluación de pacientes en los que se esté considerando el uso del tratamiento con Herceptin® (trastuzumab) (consulte el prospecto de Herceptin®).

Nota: La selección de todos los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin® se llevó a cabo mediante un análisis CTA (análisis de ensayo clínico) de investigación inmunocitoquímica. Ninguno de los pacientes de dichos ensayos fue seleccionado empleando el Bond Oracle HER2 IHC System. El Bond Oracle HER2 IHC System ha sido comparado con el Dako HercepTest™ con una serie de muestras independientes y ha demostrado proporcionar resultados con una concordancia aceptable, tal como se indica en el Resumen de concordancia clínica. No obstante, no se ha establecido la correlación real del Bond Oracle HER2 IHC System con los resultados clínicos.

La selección de todos los pacientes incluidos en los ensayos clínicos de cáncer gástrico avanzado (ToGA) de ® (ToGA) se llevó a cabo mediante el Dako HercepTest. Ninguno de los pacientes de dichos ensayos fue seleccionado empleando el Bond Oracle HER2 IHC System. El Bond Oracle HER2 IHC System se ha comparado con el Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody con una serie de muestras independientes y se ha demostrado que proporciona resultados con una concordancia aceptable, tal y como se indica en el resumen de concordancia clínica (estómago). No obstante, no se ha establecido la correlación real del Bond Oracle HER2 IHC System con los resultados clínicos.

## Resumen y explicación

### Introducción

El Bond Oracle HER2 IHC System contiene el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HER2, clon CB11. El clon CB11, inicialmente desarrollado por Corbett et al. (1) y fabricado por Novocastra Laboratories Ltd (ahora Leica Biosystems Newcastle Ltd), se dirige contra el dominio interno de la oncoproteína HER2.

En una proporción de los pacientes de mama y el cáncer gástrico, la oncoproteína HER2 se sobreexpresa como parte del proceso de transformación maligna y la progresión tumoral (2). El estado de HER2 también se ha demostrado que tiene importantes implicaciones para el tratamiento del cáncer gástrico (3). La sobreexpresión de la oncoproteína HER2 encuentra en las células de cáncer de mama sugiere HER2 como diana para una terapia a base de anticuerpos, mientras que los resultados del ensayo ToGA indican claramente que el uso de Herceptin® en cáncer gástrico junto con la quimioterapia es un tratamiento eficaz que mejora la supervivencia global en HER2 positivos cánceres gástricos (4). Herceptin® es un anticuerpo monoclonal humanizado (5) que se une con alta afinidad a la oncoproteína HER2 y se ha demostrado que inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 oncoproteína tanto in vitro como in vivo (6-8).

Desde la aparición de la primera técnica de la inmunoperoxidasa, descrita por Nakane y Pierce (9), son múltiples los avances conseguidos en el campo de la inmunohistoquímica que han permitido aumentar la sensibilidad. Un reciente avance ha sido el uso del etiquetado polimérico. Esta tecnología se ha aplicado en sistemas de detección inmunohistoquímica, así como en sistemas de detección de anticuerpos primarios (10). El sistema de detección Compact Polymer™ utilizado por el Bond Oracle HER2 IHC System forma parte de una familia de novedosas tecnologías de polimerización controlada que han sido específicamente

desarrolladas para preparar conjugados poliméricos de anticuerpos unidos a HRP. Dado que esta tecnología de polímeros se utiliza en la gama de productos Oracle, no existirá ningún problema de tinción inespecífica debida a la biotina endógena, que sí puede observarse en los sistemas de detección de estreptavidina/biotina.

## Expresión de HER2

La oncoproteína HER2 se expresa a niveles detectables mediante inmunohistoquímica en hasta un 20% de los adenocarcinomas de diversos orígenes. Entre 10% y 20% de los carcinomas ductales invasivos de la mama (11) y el 20% de los cánceres gástricos (12-14) son positivos para la oncoproteína HER2. El 90% de los casos de carcinoma ductal in situ (DCIS) de tipo comedo son positivos (15), así como la mayoría de los casos de enfermedad de Paget de la mama (16).

## Resumen de concordancia clínica

El Bond Oracle HER2 IHC System ha sido desarrollado para ofrecer una alternativa al CTA (análisis de ensayo clínico) de investigación utilizado en los estudios clínicos de Herceptin®. El rendimiento del Bond Oracle HER2 IHC System en la determinación de la sobreexpresión de la oncoproteína HER2 se evaluó en un estudio independiente comparando los resultados del Bond Oracle HER2 IHC System con los de Dako HercepTest en 431 muestras de tumor mamario, procedentes de los EE.UU. Ninguna de dichas muestras de tumor había sido obtenida de pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin®. Los resultados mostraron una concordancia del 92,34% en un análisis 2x2 (intervalos de confianza del 95% del 89,42% al 94,67%) y del 86,54% en un análisis 3x3 (intervalos de confianza del 95% del 82,95% al 89,62%) entre los resultados de los dos análisis.

El rendimiento del Bond Oracle HER2 IHC System para la determinación de la sobreexpresión de la oncoproteína HER2 en adenocarcinomas del estómago (incluyendo la unión gastroesofágica) se ha evaluado en un estudio independiente que compara los resultados del Bond Oracle HER2 IHC System con el Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody en 287 muestras de tumores gástricos, de origen chino. Ninguna de dichas muestras de tumor había sido obtenida de pacientes incluidos en los ensayos clínicos de Herceptin®. Los resultados mostraron una concordancia del 95,12% en un análisis 2x2 (intervalos de confianza del 95% del 91,95% al 97,31%) y del 89,90% en un análisis 3x3 (intervalos de confianza del 95% del 85,81% al 93,13%) entre los resultados del Bond Oracle HER2 IHC System y del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) respectivamente.

## Principio de procedimiento

El Bond Oracle HER2 IHC System contiene los componentes necesarios para completar un procedimiento de tinción inmunohistoquímica para tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. Tras la incubación con el HER2 Primary Antibody (clon CB11) listo para usar, este sistema emplea una tecnología Compact Polymer lista para ser utilizada. La conversión enzimática del cromogen posteriormente añadido provoca la formación de un producto de reacción visible en el sitio antigénico. Los cortes de tejido pueden así ser sometidos a contratinción, deshidratación, clarificación y montaje. Los resultados se interpretan usando microscopía óptica. Para validar los ciclos de tinción se proporcionan portaobjetos de control con cuatro líneas celulares de cáncer mamario humano fijadas con formalina e incluidas en parafina. Estas cuatro líneas celulares acreditan la expresión de la oncoproteína HER2 a intensidades 0, 1+, 2+ y 3+. La intensidad de la tinción de dichas líneas celulares se correlaciona con la carga de receptor de oncoproteína HER2 por célula y con el estado de amplificación del gen HER2.

El Bond Oracle HER2 IHC System (código de producto TA9145) está diseñado para utilizarse en el sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado Leica Biosystems' BOND.

## Componentes suministrados

Los materiales que se enumeran a continuación (Tabla 1) son suficientes para teñir 150 portaobjetos (60 portaobjetos de prueba incubados con HER2 Primary Antibody, 60 portaobjetos de prueba incubados con HER2 Negative Control, 15 HER2 Control Slides incubados con HER2 Primary Antibody y 15 controles positivos internos de tejido incubados

con HER2 Primary Antibody). El número de pruebas se basa en la dispensación automatizada de 150 µL por portaobjetos. El kit dispone de materiales suficientes para un máximo de 15 ciclos de tinción BOND individuales.

<b>HER2 Control Slides, (x15)</b>	Cortes de líneas celulares de cáncer mamario humano fijados con formalina e incluidos en parafina que acreditan la expresión de la oncoproteína HER2 a intensidades de 0, 1+, 2+ y 3+ cuando la tinción se realiza conforme el protocolo suministrado. Dichos cortes están totalmente adheridos y no requieren un calentamiento adicional.
<b>HER2 Primary Antibody, 13,5 mL</b>	Contiene el anticuerpo monoclonal IgG de ratón, clon CB11 purificado por afinidad y listo para usar, así como 2-metil-2H-isotiazol-3-ona al 0,035%.
<b>HER2 Negative Control, 9 mL</b>	Contiene el anticuerpo monoclonal IgG de ratón listo para usar a una concentración equivalente al HER2 Primary Antibody, así como 2-metil-2H-isotiazol-3-ona al 0,035%.
<b>Peroxide Block, 22,5 mL</b>	Contiene peróxido de hidrógeno al 3-4%.
<b>Post Primary, 22,5 mL</b>	IgG de conejo anti-ratón (<10 µg/mL) en salino tamponado con Tris que contiene suero animal al 10% (v/v) y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona al 0,01%.
<b>Polymer, 22,5 mL</b>	IgG de cabra anti-conejo poli-HRP (<25 µg/mL) en salino tamponado con Tris que contiene suero animal al 10% (v/v) y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona al 0,01%.
<b>DAB Part 1, 2,25 mL</b>	Contiene tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina 66 mM, en una disolución de estabilizador.
<b>DAB Part B (x2), 22,5 mL</b>	Contiene peróxido de hidrógeno a ≤0,1% (v/v).
<b>Hematoxylin, 22,5 mL</b>	Contiene hematoxilina a <0,1%.

Tabla 1. Componentes del Bond Oracle HER2 IHC System

## Instrucciones de uso

Todos los reactivos suministrados están específicamente formulados para ser utilizados en este análisis y los números de lote correspondientes son específicos de cada Bond Oracle HER2 IHC System. Para que el análisis resulte válido, no debe sustituirse ninguno de los reactivos.

## Almacenamiento y estabilidad

Almacenar a 2–8 °C. No congelar. Volver a enfriar a 2–8 °C inmediatamente después del uso. Cualquier desviación de estas condiciones invalidará el análisis. Asegúrese de que el Bond Oracle HER2 IHC System utilizado se encuentra dentro de la fecha de caducidad designada. Los signos que indican la contaminación y/o inestabilidad del Bond Oracle HER2 IHC System son: turbidez de las disoluciones, aparición de olor y presencia de precipitado. El almacenamiento en condiciones diferentes a las arriba especificadas debe ser verificado por el usuario.

## Preparación de muestras

Todas las muestras deben prepararse para preservar el tejido que se va a someter a tinción inmunohistoquímica. Para ello, en todas las muestras deben emplearse los métodos estándares de procesado de tejidos (17).

Se recomienda preparar los tejidos empleando fijadores a base de formalina, procesarlos de forma rutinaria e incluirlos en parafina. Así, por ejemplo, las muestras de resección deben bloquearse a un grosor de 3–4 mm y deben fijarse durante 18–24 horas en formalina tamponada neutra al 10%. A continuación, los tejidos deben deshidratarse en una serie de alcoholes y clarificarse con xileno, seguido de impregnación con cera de parafina fundida, mantenida a una temperatura máxima de 60 °C. Las muestras de tejido deben cortarse a un grosor de entre 3 y 5 µm.

Los portaobjetos necesarios para la evaluación de la oncoproteína HER2 y los necesarios para la verificación del tumor deben prepararse al mismo tiempo. Para preservar la antigenicidad, los cortes de tejido montados sobre portaobjetos (Leica BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040) deben teñirse en un plazo de 4-6 semanas desde la realización del corte si se guardan a temperatura ambiente (18–24 °C). Tras el corte, se recomienda incubar los portaobjetos durante 12–18 horas (durante la noche) a 37 °C. Los cortes que requieran una adherencia adicional pueden incubarse a 60 °C durante una hora más.

En EE.UU., la Ley de Mejora de Laboratorios Clínicos de 1988 exige en su punto 42 CFR 493.1259(b) que "El laboratorio debe guardar los portaobjetos teñidos durante al menos diez años a partir de la fecha de examen y debe guardar los bloques de muestras durante al menos dos años a partir de la fecha de examen".

## Advertencias y precauciones

*Sólo para usuarios profesionales.*

Uno o más componentes del producto son peligrosos.

Como regla general, las personas con edad inferior a los 18 años no podrán utilizar este producto. Los usuarios deben ser debidamente instruidos acerca del procedimiento de trabajo adecuado, las propiedades peligrosas del producto y las necesarias instrucciones de seguridad.

Los síntomas de sobreexposición a ProClin™ 950, el conservante utilizado en los reactivos Oracle, pueden incluir irritación de la piel y los ojos, así como irritación de las membranas de la mucosa y de las vías respiratorias superiores. La concentración de ProClin™ 950 en este producto es de hasta un máximo de 0,35%. Estas disoluciones no satisfacen los criterios OSHA para sustancias peligrosas. Existe una Material Safety Data Sheet disponible bajo petición o en [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

Las muestras, antes y después de ser fijadas, y todos los materiales expuestos a ellas, deben ser tratados como sustancias capaces de transmitir infecciones y deben eliminarse tomando las precauciones adecuadas.

Nunca pipetee los reactivos con la boca y evite el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y las membranas de la mucosa. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles de su cuerpo, lávelas con abundante agua. Busque asistencia médica. Consulte la normativa estatal, regional o local sobre la eliminación de componentes potencialmente tóxicos.

Minimice la contaminación microbiana de los reactivos para evitar un posible aumento de la tinción inespecífica.

## Procedimiento

### A. Reactivos necesarios no suministrados

- BOND Dewax Solution (código de producto AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (código de producto AR9961)
- BOND Wash Solution x10 Concentrate (código de producto AR9590)
- Disolventes estándares utilizados en inmunohistoquímica (por ejemplo, etanol, absoluto y de grado)
- Xileno (o sustitutos de xileno)

- Medio de montaje
- Agua destilada o desionizada

## **B. Equipo necesario no suministrado**

- Sistema(s) de tinción avanzado(s) y totalmente automatizado(s) Leica Biosystems BOND-MAX y BOND-III
- BOND Universal Covertiles (código de producto S21.2001, S21.4583 o S21.4611)
- BOND Mixing Stations (código de producto S21.1971)
- Horno de secado, capaz de mantener 60 °C
- Microscopio óptico (aumento de objetivo 4–40x)
- Portaobjetos (Leica BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040)
- Cubreobjetos
- BOND Slide Label & Print Ribbon (código de producto S21.4564)
- BOND Aspirating Probe Cleaning System (código de producto CS9100)

## **C. Metodología**

- Antes de utilizar esta metodología, los usuarios deben recibir una completa formación en técnicas inmunohistoquímicas totalmente automatizadas BOND.
- Para cada uno de los cortes de prueba que se vaya a teñir con el HER2 Primary Antibody se requerirá un corte idéntico para teñirlo con el HER2 Negative Control. El corte del control negativo permite diferenciar entre la tinción específica y la inespecífica en el sitio del antígeno. Cada ciclo de tinción BOND debe incluir un HER2 Control Slide. Al final del protocolo de tinción, si las líneas celulares no acreditan los patrones de tinción correctos (consulte Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide), el ciclo será considerado como inválido.

## **D. Disposición de portaobjetos**

Con cada portaobjetos debe utilizar un BOND Universal Covertile (código de producto S21.2001, S21.4583 o S21.4611) nuevo. El uso de BOND Universal Covertiles que hayan sido previamente utilizados para tinción inmunohistoquímica o hibridación in situ no ha sido validado para este caso.



La disposición en la bandeja de portaobjetos (Tabla 2) permite optimizar el rendimiento del Bond Oracle HER2 IHC System y de las 60 pruebas completas que se vayan a obtener.

Posición del portaobjetos	Descripción del portaobjetos	Reactivo	Tipo de tejido	Icono del portaobjetos
1	Caso 1	*HER2 Negative Control	Prueba	
2	Caso 2	*HER2 Negative Control	Prueba	
3	Caso 3	*HER2 Negative Control	Prueba	
4	Caso 4	*HER2 Negative Control	Prueba	
5	Caso 1	*HER2PrimaryAntibody	Prueba	
6	Caso 2	*HER2PrimaryAntibody	Prueba	
7	Caso 3	*HER2PrimaryAntibody	Prueba	
8	Caso 4	*HER2PrimaryAntibody	Prueba	
9	HER2 Control Slide	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	
10	Control interno de tejido	*HER2PrimaryAntibody	Positivo	

Tabla 2. Disposición en la bandeja de los portaobjetos, mostrando el tipo de tejido y el reactivo

## E. Procedimiento detallado

Siga los siguientes pasos para configurar una bandeja de portaobjetos conforme a la disposición descrita en la Tabla 2. Estas instrucciones deben leerse junto con el BOND System User Manual.

1. En el instrumento BOND, compruebe que la capacidad de los envases a granel y de los envases para desechos peligrosos es suficiente para realizar los ciclos de tinción necesarios.
2. Compruebe que dispone del alcohol adecuado, agua destilada o desionizada, BOND Dewax Solution (suministrada como disolución lista para usar), BOND Epitope Retrieval Solution 1 (suministrada como disolución lista para usar) y BOND Wash Solution (suministrada como concentrado 10x) en los envases de reactivos a granel para poder llevar a cabo los ciclos de tinción necesarios.
3. Compruebe que hay instalada una BOND Mixing Station limpia.
4. Ponga en marcha el sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND.

5. Ponga en marcha controlador BOND acoplado al sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND.
6. Abra el software BOND.
7. En el caso de un Bond Oracle HER2 IHC System nuevo, escanee los códigos de barras de las bandejas de reactivos con el escáner portátil para introducir el sistema en el inventario de reactivos BOND.
8. Vaya a la pantalla "Slide setup" y haga clic en "Add case".
9. Introduzca los detalles del primer caso. Compruebe que el volumen de dispensación está fijado en 150 µL y que el protocolo de preparación es "Dewax". Haga clic en [OK].
10. Con el caso resaltado en la pantalla "Slide setup", haga clic en "Add slide".
11. En primer lugar, añada portaobjetos de pruebas de pacientes. Compruebe que el tipo de tejido está ajustado en "Test tissue".
12. Confirme que el volumen de dispensación está fijado en 150 µL y que el protocolo de preparación es "Dewax".
13. Seleccione los valores del modo de tinción "Single" y "Oracle" (no haga clic en "Oracle control").
14. Seleccione el proceso IHC.
15. Seleccione "HER2 Negative Control" en la lista de marcadores. La pestaña "Protocols" tendrá seleccionado por defecto el protocolo de tinción correcto (\*IHC Protocol H) y el protocolo HIER (\*HIER 25 min with ER1 (97)).
16. Haga clic en "Add slide". Se creará el portaobjetos del reactivo de control negativo.
17. Aún en el cuadro de diálogo "Add slide", seleccione "HER2 Primary Antibody" en la lista de marcadores. Los protocolos predeterminados y el resto de los ajustes permanecerán inalterados.
18. Haga clic en "Add slide". Se creará el portaobjetos de prueba.
19. Repita los pasos 8 a 18 hasta que se hayan creado todos los casos y portaobjetos de pruebas de paciente.
20. A continuación, cree el HER2 Control Slide. Añádalo al último caso o cree un nuevo caso para portaobjetos de control, dependiendo de las prácticas estándares de su laboratorio.  
  
Nota importante: Un requisito del Bond Oracle HER2 IHC System es que se incluya un HER2 Control Slide en cada ciclo (esto es, en cada bandeja de portaobjetos) con el fin de validar el ensayo.
21. En el cuadro de diálogo "Add slide", fije el tipo de tejido en "Positive tissue".
22. Haga clic en "Oracle control".
23. Seleccione el número de lote del HER2 Control Slide en la lista "Lot No". El número de lote va inscrito en la parte de la etiqueta del portaobjetos.  
  
Nota importante: El HER2 Control Slide debe proceder del mismo Bond Oracle HER2 IHC System que se va a utilizar.

24. Seleccione "\*"HER2 Primary Antibody" en la lista de marcadores. Retenga el volumen de dispensación, el modo de tinción y los ajustes del proceso y del protocolo.
25. Haga clic en "Add slide" para añadir el HER2 Control Slide.
26. Finalmente, añada un portaobjetos de control positivo interno de tejido.
27. Deseleccione "Oracle control".
28. Seleccione "\*"HER2 Primary Antibody" en la lista de marcadores. Retenga el volumen de dispensación, el modo de tinción y los ajustes del proceso y del protocolo. El tipo de tejido permanece en "Positive tissue".
29. Haga clic en "Add slide". Esto completa la creación de portaobjetos.
30. Imprima las etiquetas de los portaobjetos. Todas las etiquetas de portaobjetos Oracle llevan "OC" impreso en ellas. La etiqueta para el HER2 Control Slide también incluye el número de lote del Bond Oracle HER2 IHC System.
31. Coloque adecuadamente las etiquetas en los portaobjetos.
32. Abra las tapas de todos los envases del Bond Oracle HER2 IHC System y cargue la bandeja de reactivos en el BOND.
33. Coloque los portaobjetos en la bandeja de portaobjetos en el orden indicado en el apartado D, Tabla 2. Coloque Covertiles nuevos.
34. Cargue la bandeja de portaobjetos en el BOND y pulse el botón "Load/Unload".
35. Confirme que los portaobjetos han sido escaneados y haga clic en el botón "Run (Play)" de la pantalla "System status".
36. Compruebe que el campo del indicador de bandeja muestra "Proc (OK)" y que se visualizan el número de lote y el tiempo de finalización.
37. Cuando haya completado el ciclo, pulse el botón "Load/Unload" y saque las bandejas de portaobjetos del BOND.
38. Retire los Covertiles y lave los portaobjetos con agua desionizada.
39. Deshidrate, clarifique y monte los cortes de tejido.

## Control de calidad

Las diferencias existentes en el laboratorio del usuario en cuanto a fijación de tejido, procesado e inclusión pueden generar una importante variabilidad de los resultados, por lo que será necesario el uso regular de controles internos además de los HER2 Control Slides suministrados por Leica Biosystems en el Bond Oracle HER2 IHC System. Consulte las directrices de control de calidad del College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry; consulte también Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) y Special Report: Quality Control in Immunohistochemistry (18) del CLSI (anteriormente NCCLS). Consulte también la Tabla 3 siguiente para los tipos de controles de calidad en inmunohistoquímica y su finalidad.

Muestra*	Descripción	Tinción de HER2 Primary Antibody	Tinción de HER2 Negative Control
HER2 Control Slide	Suministrado en el Bond Oracle HER2 IHC System.	Procedimiento de tinción de controles, indica la validez del rendimiento del reactivo.	Detección de tinción inespecífica de fondo
Tejido de control positivo interno	Tejido que contiene el antígeno diana. El control ideal es un tejido con tinción ligeramente positiva que permita detectar los cambios sutiles en la sensibilidad del anticuerpo primario.	Controla todos los pasos del análisis. Valida la preparación de tejido y el rendimiento de tinción del Bond Oracle HER2 IHC System.	
Componente tisular de control interno negativo	Tejidos o células teóricamente negativos (podrían encontrarse en componentes tisulares de paciente o en componentes tisulares de control positivo/negativo).	Detección de reactividad cruzada inespecífica del anticuerpo con células/ componentes celulares.	

\*Fijada y procesada según la muestra de paciente

Tabla 3. Controles de calidad en inmunohistoquímica y su finalidad

Los tejidos de control deben proceder de muestras de biopsias o muestras quirúrgicas fijadas con formalina, procesadas e incluidas en parafina lo antes posible y de la misma manera que las muestras de paciente. Las muestras deben manipularse adecuadamente para preservar la antigenicidad del tejido para la tinción inmunohistoquímica. Para ello, en todas las muestras deben emplearse los métodos estándares de procesado de tejidos (17).

### HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Cada uno de los HER2 Control Slides suministrados contiene cuatro estructuras de líneas celulares de cáncer mamario humano fijadas con formalina e incluidas en parafina con intensidades de tinción de grado 0, 1+, 2+ y 3+. En cada ciclo de prueba (es decir, en cada bandeja de portaobjetos) debe incluirse un portaobjetos. La correcta evaluación de los HER2 Control Slides suministrados por Leica Biosystems indica la validez de la prueba (consulte la Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide). Los HER2 Control Slides suministrados con este sistema sirven únicamente para validar el rendimiento de los reactivos y no para verificar la correcta preparación de los tejidos.

### Tejido de control positivo interno – HER2 Primary Antibody

Si se usan componentes tisulares de control positivo interno, éstos deben proceder de muestras de biopsias o muestras quirúrgicas fijadas con formalina, procesadas e incluidas lo antes posible de la misma manera que las muestras de paciente. Los controles positivos de tejido se emplean como una indicación de la correcta preparación de los tejidos y de la validez de las técnicas de tinción empleadas. En cada ciclo de prueba debe incluirse al menos un componente de control positivo. El corte de tejido de control positivo debe acreditar una tinción ligeramente positiva que permita detectar cambios sutiles en la sensibilidad del anticuerpo primario.

Nota: Los componentes tisulares de control positivo sólo deben utilizarse para monitorizar el correcto rendimiento de los tejidos procesados junto con los reactivos de prueba, NO como una ayuda para formular una interpretación específica de las muestras de paciente. Si el tejido de control positivo no es capaz de acreditar una adecuada tinción positiva, los resultados obtenidos con las muestras de paciente deberán considerarse inválidos.

Como material de control interno también se puede utilizar de forma eficiente un bloque de control multitejido que contenga tumores que representen los 4 grados HER2.

### **Componente tisular de control negativo interno – HER2 Primary Antibody**

Si se usan componentes tisulares de control negativo interno, éstos deben proceder de muestras recientes de biopsias o muestras quirúrgicas fijadas con formalina, procesadas e incluidas lo antes posible de la misma manera que las muestras de paciente. El uso en cada ciclo de tinción de un tejido de control con conocida tinción negativa de la oncoproteína HER2 permite verificar la especificidad del anticuerpo primario y sirve de indicación sobre cualquier tinción inespecífica de fondo. La extensa variedad de tipos de células diferentes presentes en la mayoría de los cortes de tejido ofrece sitios de control negativo interno (este punto debe ser verificado por el usuario). Los conductos mamarios normales no asociados al tumor pueden servir de referencia para demostrar la validez del análisis. Si se produce tinción específica del tejido de control negativo interno, los resultados obtenidos con las muestras de paciente deberán considerarse inválidos.

Un bloque de control multitejido que represente los 4 grados de HER2 puede utilizarse como tejido de control positivo y como tejido de control negativo.

### **Tejido de paciente – HER2 Negative Control**

Utilice el HER2 Negative Control suministrado en lugar del HER2 Primary Antibody sobre un corte de cada muestra de paciente para evaluar la tinción inespecífica y para conseguir una interpretación precisa de la tinción específica de la oncoproteína HER2 en el sitio antigénico.

### **Tejido de paciente – HER2 Primary Antibody**

La intensidad de la tinción positiva debe evaluarse en el contexto de cualquier tinción inespecífica de fondo con el HER2 Negative Control. Al igual que en cualquier otra prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no queriendo decir que el antígeno no esté presente en las células/tejidos analizados. Consulte los apartados Lógica del orden de screening de portaobjetos, Limitaciones, Evaluación de rendimiento e Inmunorreactividad para obtener información específica acerca de la inmunorreactividad del Bond Oracle HER2 IHC System.

### **Verificación del análisis**

Antes de usar por primera vez cualquier sistema de tinción o anticuerpo en un procedimiento diagnóstico, el usuario debe verificar la especificidad del anticuerpo utilizándolo en diversas pruebas sobre una serie de tejidos internos con conocido perfil inmunohistoquímico positivo y negativo. Consulte el apartado Control de calidad anterior y los requisitos de control de calidad del CAP Certification Program for Immunohistochemistry y/o Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (17) del CLSI (anteriormente NCCLS). Dichos procedimientos de control de calidad deben repetirse en cada nuevo lote de anticuerpos o siempre que se produzca un cambio en los parámetros del análisis. Para verificar el análisis resulta adecuado utilizar carcinoma invasivo humano (infiltrante) de los conductos mamarios con conocidas intensidades de tinción de la oncoproteína HER2 que varían de 0 a 3+, así como otros tejidos negativos adecuados.

## Interpretación de la tinción - Mama

A la hora de determinar la expresión de la oncoproteína HER2, la escala de la Tabla 4 sólo debe utilizarse para evaluar el patrón y la intensidad de tinción de la membrana. La evaluación de los portaobjetos debe ser realizada por un patólogo con ayuda de un microscopio de campo brillante. Para evaluar la tinción inmunohistoquímica y el nivel de intensidad resulta apropiado el uso de un objetivo con un aumento de 10x. Sin embargo, la confirmación de dicho grado requerirá el uso de un objetivo con un aumento de 20–40x. La tinción citoplasmática debe considerarse como una tinción inespecífica y no debe incluirse en la evaluación de la intensidad de la tinción de la membrana (19). Como ayuda para diferenciar los grados de tinción 0, 1+, 2+ y 3+, consulte la Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide con imágenes representativas de las intensidades de tinción. El grado de intensidad sólo debe determinarse en las muestras de pacientes con carcinoma invasivo de mama. En los casos en los que exista carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo en la misma muestra, sólo deberá determinarse el grado de intensidad del componente invasivo.

Patrón de tinción inmunohistoquímica	Grado	Evaluación
No se observa tinción o la tinción de la membrana se observa en menos del 10% de las células tumorales.	0	Negativo
Se detecta una ligera/casi imperceptible tinción de la membrana en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen por la parte de la membrana.	1+	Negativo
Se observa una tinción débil a moderada de toda la membrana en más del 10% de las células tumorales.	2+	Equívoco (débilmente positivo)
Se observa una tinción fuerte de toda la membrana en más del 10% de las células tumorales.	3+	Fuertemente positivo

Tabla 4. Interpretación de la tinción de HER2

Los resultados de tinción del Bond Oracle HER2 IHC System se interpretan como negativos para la expresión de la oncoproteína HER2 si la intensidad de la tinción es de grado 0 y 1+, como ambiguos (débilmente positivos) si la intensidad de la tinción es de grado 2+ y como fuertemente positivos si la intensidad de la tinción es de grado 3+. El Bond Oracle HER2 IHC System no está diseñado para proporcionar información sobre pronósticos para el paciente y/o el médico y no ha sido validado para tal fin. En cada evaluación de tinción, los portaobjetos deben examinarse en el orden que se detalla a continuación para así poder determinar la validez del ciclo de tinción y para permitir una evaluación semicuantitativa de la intensidad de la tinción del tejido de muestra.

## Interpretación de la tinción: Estómago

A la hora de determinar la expresión de la oncoproteína HER2, la escala de las Tablas 5 y 6 solo debe utilizarse para evaluar el patrón y la intensidad de tinción de la membrana. La evaluación de los portaobjetos debe ser realizada por un patólogo con ayuda de un microscopio de campo brillante. Para evaluar la tinción inmunohistoquímica y el nivel de intensidad resulta apropiado el uso de un objetivo con un aumento de 10x. Sin embargo, la confirmación de dicho grado requerirá el uso de un objetivo con un aumento de 20–40x. La tinción citoplasmática debe considerarse como una tinción no específica y no debe incluirse en la evaluación de la intensidad de la tinción de la membrana (15). Como ayuda para diferenciar los grados de tinción 0, 1+, 2+ y 3+, consulte la Bond Oracle HER2 IHC System Gastric Interpretation Guide con imágenes representativas de las intensidades de tinción. El grado de intensidad solo debe determinarse en las muestras de pacientes con adenocarcinoma de estómago o unión gastroesofágica.

Muestras quirúrgicas	Patrón de tinción inmunohistoquímica	Grado	Evaluación
	No se observa tinción o la tinción de la membrana se observa en menos del 10% de las células tumorales.	0	Negativo
	Se detecta una ligera/casi imperceptible tinción de la membrana en más del 10% de las células tumorales. Solo se tiñe una parte de la membrana de las células.	1+	Negativo
	Se observa una tinción de débil a moderada de la membrana completa, basolateral o lateral en un 10% o más de las células tumorales.	2+	Equívoco (débilmente positivo)
	Se observa una tinción fuerte de la membrana completa, basolateral o lateral en más del 10% de las células tumorales.	3+	Fuertemente positivo

Tabla 5. Interpretación de la tinción HER2 en muestras quirúrgicas de cáncer gástrico

Muestras de biopsias	Patrón de tinción inmunohistoquímica	Grado	Evaluación
	No se observa tinción en ninguna célula tumoral	0	Negativo
	Se observa un agrupamiento de células tumorales con una ligera/casi imperceptible tinción de la membrana, con independencia del porcentaje de células tintadas	1+	Negativo
	Se observa un agrupamiento de células tumorales con una tinción de débil a moderada de la membrana completa, basolateral o lateral, con independencia del porcentaje de células tintadas	2+	Equívoco (débilmente positivo)
	Se observa un agrupamiento de células tumorales con una tinción fuerte de la membrana completa, basolateral o lateral, con independencia del porcentaje de células tintadas	3+	Fuertemente positivo

Tabla 6. Interpretación de la tinción HER2 en muestras de biopsias de cáncer gástrico

Para la interpretación de biopsias tintadas del Bond Oracle HER2 IHC System se recomienda un agrupamiento de al menos cinco células tumorales.

## Lógica del orden de screening de portaobjetos

Los portaobjetos deben examinarse en el siguiente orden:

### 1. HER2 Control Slide – HER2 Primary Antibody

Un análisis válido con el Oracle HER2 Control Slide muestra lo siguiente:

- Presencia de una fuerte tinción marrón de toda la membrana celular en la línea celular de control 3+ SK-BR-3.
- Presencia de una tinción marrón débil a moderada de toda la membrana celular en la línea celular de control 2+ MDA-MB-453.
- Presencia de una ligera/casi imperceptible tinción marrón incompleta de la membrana celular en la línea celular de control 1+ MDA-MB-175.
- Ausencia de tinción en la línea celular de control 0 MDA-MB-231.

Nota importante: Una característica de la línea celular de control 1+ MDA-MB-175 es su distintivo patrón de crecimiento en el que las células forman agrupamientos. Dichos agrupamientos pueden dar lugar a un región luminal continua con borde en cepillo a través del agrupamiento de células. La tinción del borde en cepillo será mayor que la del resto de la membrana celular. El patrón correcto de tinción 1+ de la oncoproteína HER2 es aquel que presenta una tinción incompleta ligera/casi imperceptible de la membrana celular. En esta línea celular también puede observarse la inmunotinción puntiforme de la región Golgi del citoplasma.

## **2. Tejido de control positivo interno – HER2 Primary Antibody**

La PRESENCIA de tinción marrón de la membrana debe observarse a un nivel correspondiente al conocido estado de la oncoproteína HER2 en el control positivo elegido.

## **3. Componente tisular de control negativo interno – HER2 Positive Control**

Debe observarse la AUSENCIA de tinción de la membrana. Un componente tisular de control negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del sistema de detección para los componentes celulares/células diana. Si se produce tinción de la membrana en el componente tisular de control negativo, los resultados obtenidos con la muestra de paciente deberán considerarse inválidos.

## **4. Tejido de paciente – teñido usando el HER2 Negative Control**

La AUSENCIA de tinción de la membrana verifica el etiquetado específico del antígeno diana por parte del anticuerpo primario. La presencia de cualquier otra tinción marrón en el citoplasma de la muestra tratada con el HER2 Negative Control, como de tejido conectivo, leucocitos, eritrocitos o tejido necrótico, debe considerarse como una tinción inespecífica de fondo y debe ser tenida en cuenta.

## **5. Tejido de paciente – teñido usando el HER2 Primary Antibody**

Los niveles de expresión de la oncoproteína HER2 se determinan mediante los criterios definidos en la Tabla 4-6 y en la Bond Oracle HER2 IHC System Interpretation Guide.

## **Limitaciones**

### **A. Limitaciones generales**

La inmunohistoquímica es una técnica multipaso de laboratorio que se emplea como ayuda en la interpretación y determinación de las características histopatológicas. Se trata de una técnica que requiere una formación especializada en todos los aspectos del procedimiento (incluyendo la selección de los adecuados reactivos, tejidos, fijación, procesamiento y preparación de portaobjetos IHC) y de la interpretación.

La tinción inmunohistoquímica de tejidos varía en función de la manipulación, la fijación y el procesamiento del tejido antes de su tinción. Una inapropiada fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte o la contaminación con otros tejidos o fluidos puede generar artefactos, captura de anticuerpos o resultados de falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión o a irregularidades inherentes del tejido (21). Una contratinción excesiva o incompleta puede influir negativamente en la correcta interpretación de los resultados.

La tinción inespecífica, si aparece, suele tener un aspecto difuso. La tinción esporádica del tejido conectivo también puede observarse en cortes de tejidos que hayan sido excesivamente fijados con formalina. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que las células necróticas o degeneradas suele teñirse de forma inespecífica (22). Pueden producirse resultados de falsos positivos debido a la unión no inmunológica de proteínas o productos de reacción del sustrato. Dichos falsos positivos también pueden deberse a enzimas endógenas como la pseudoperoxidasa (eritrocitos) o la peroxidasa endógena (citocromo C), dependiendo del tipo de tinción inmunohistoquímica utilizado.



Los tejidos de pacientes infectados con el virus de la Hepatitis B y que contengan el antígeno superficial del virus de la Hepatitis B (HBsAg) pueden mostrar tinción inespecífica con la peroxidasa del rábano (23).

Una tinción inmunohistoquímica inesperada o una variación en la tinción pueden ser el resultado de alteraciones en los niveles de expresión de los genes codificantes o antígenos. Cualquier cambio en los patrones de tinción esperados debe interpretarse en combinación con el resto de las investigaciones diagnósticas.

La interpretación de la tinción inmunohistoquímica debe complementarse con estudios morfológicos y con el uso del adecuado material de control y debe evaluarse en el contexto del historial clínico del paciente y de cualquier otra prueba diagnóstica realizada por un patólogo cualificado.

El determinación del rendimiento del análisis (es decir, evaluaciones de la adecuación de los controles positivo y negativo) y la interpretación de cualquier tinción inmunohistoquímica o de la ausencia de la misma deben llevarse a cabo en un laboratorio debidamente acreditado/autorizado bajo la supervisión de un patólogo adecuadamente cualificado y experimentado, que será el responsable de la evaluación global del análisis inmunohistoquímico y de su interpretación.

## B. Limitaciones específicas del producto

Este producto no está diseñado para utilizarse en citometría de flujo, por lo que las características de rendimiento no han sido determinadas para la citometría de flujo.

Se han observado resultados de falsos negativos como consecuencia de la degradación de los antígenos en el corte de tejido. Los portaobjetos necesarios para la evaluación de la oncoproteína HER2 y los necesarios para la verificación del tumor deben prepararse al mismo tiempo. Para preservar la antigenicidad, los cortes de tejido montados sobre portaobjetos (Leica BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040) deben teñirse en un plazo de 4-6 semanas desde la realización del corte si se guardan a temperatura ambiente (18–24 °C). Tras el corte, se recomienda incubar los portaobjetos durante 12–18 horas (durante la noche) a 37 °C. Los cortes que requieran una adherencia adicional pueden incubarse a 60 °C durante una hora más.

Se observará una mínima variación natural del perfil inmunohistoquímico entre los diferentes lotes de crecimiento de las líneas celulares utilizadas en el Bond Oracle HER2 IHC System. Dicha variación natural se encuentra dentro de unos niveles de tolerancia perfectamente aceptables para una entidad biológica y no afectan a la interpretación ni al rendimiento del sistema.

La caracterización de las líneas celulares utilizando citometría de flujo e hibridación in situ, tal como se presentan en la Tabla 7, también está sujeta a variaciones biológicas naturales. También se detallan las variaciones técnicas y de interpretación de las líneas celulares evaluadas mediante hibridación fluorescente in situ (24).

La evaluación de los HER2 Control Slides debe tener en cuenta todas las fechas de caducidad relevantes. Almacenar el Bond Oracle HER2 IHC System a 2–8 °C. No congelar. Volver a enfriar a 2–8 °C inmediatamente después del uso. Cualquier desviación de estas condiciones invalidará el análisis.

No sustituya los reactivos del Bond Oracle HER2 IHC System por ningún otro componente suministrado por Leica Biosystems o por cualquier otro fabricante. Al hacerlo, invalidará el análisis.

Es esencial que todos los pasos detallados en las secciones C a E (Procedimiento) se lleven a cabo en el orden prescrito. Cualquier desviación de dicho orden invalidará el análisis.

Es esencial que en el análisis se utilicen únicamente tejidos fijados con fijadores a base de formalina. El uso de cualquier otro tipo de fijador invalidará el análisis.

Los cortes de tejido con un grosor diferente al rango recomendado no han sido validados. Por tanto, el uso de cualquier otro grosor de corte puede invalidar el análisis.

## Datos de la línea celular

Línea celular	Perfil del Bond Oracle HER2 IHC System	Carga de receptor HER2 por célula*	Estado de amplificación del gen HER2*	
			Número de copia de HER2	Relación de genes HER2:Chr17
SK-BR-3	3+	4,3 x 10 <sup>5</sup>	13,35	3,55
MDA-MB-453	2+	1,4 x 10 <sup>5</sup>	5,73	2,05
MDA-MB-175	1+	6,3 x 10 <sup>4</sup>	3,33	1,20
MDA-MB-231	0	9,3 x 10 <sup>3</sup>	3,15	1,13

\*Análisis de la carga de receptor HER2, evaluada mediante citometría de flujo. \* Estado de amplificación del gen HER2, evaluada mediante FISH de doble sonda (HER2:Cromosoma 17).

Tabla 7. Perfil de HER2 Control Slide

## Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System vs. Dako HercepTest - Mama

La primera parte del estudio examinó la adecuación del Bond Oracle HER2 IHC System para utilizarse como una ayuda para la determinación del tratamiento con terapia de Herceptin® (trastuzumab). El estudio fue diseñado para examinar la concordancia entre el Bond Oracle HER2 IHC System y el Dako HercepTest, considerado como el "máximo estándar" para este análisis. El criterio de aceptación se definió como una concordancia global superior al 75% entre las dos pruebas con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

El estudio se llevó a cabo como una evaluación enmascarada realizada en dos sitios de los EE.UU. A cada sitio se le suministraron muestras de cáncer mamario fijadas con formalina e incluidas en parafina con estado HER2 conocido. Los casos se seleccionaron en orden consecutivo inverso a partir de archivos clínicos, que representaban el flujo consecutivo de casos de un departamento de histopatología para pruebas clínicas, y fueron analizados de forma independiente a cualquier otro factor pronóstico y/o predictivo, sin introducir ninguna desviación en la cohorte. Se analizaron cohortes de 160 y 292 muestras en el Sitio 1 y el Sitio 2, respectivamente. Cada una de las cohortes poseía una distribución equitativa de casos equívocos/positivos (2+, 3+) y negativos (0, 1+), basada en los grados HER2 IHC previamente asignados, proporcionando una muestra total del estudio de 452 muestras. Doce (12) muestras se consideraron inadecuadas debido a la ausencia de suficiente tumor invasivo y fueron retiradas del estudio. En otras nueve (9) muestras no se pudo determinar el grado de tinción como resultado del levantamiento del tejido de la superficie del portaobjetos, obteniéndose una muestra final del estudio de 431 muestras.

Todos los casos se tiñeron con el HercepTest conforme a las instrucciones del fabricante especificadas en el prospecto. Cortes secuenciales de cada caso se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado Leica Biosystems' BOND. Todos los casos fueron desligados de los datos de identificación del paciente y se vincularon a datos clínicos relativos al tamaño del tumor, el estadio del tumor, el grado del tumor y el estado de los receptores de estrógenos.

Todos los portaobjetos obtenidos fueron enmascarados y su intensidad de tinción fue evaluada de forma aleatoria por observadores cualificados de ambos sitios. Para el análisis de concordancia 2x2, la tinción se interpretó como negativa si la intensidad era de grado 0 ó 1+ y como positiva si era de grado 2+ ó 3+. Para el análisis de concordancia 3x3, la tinción se interpretó como negativa si la intensidad era de grado 0 ó 1+, como equívoca si era de grado 2+ y como positiva si era de grado 3+. A continuación se analizaron los datos para llegar a un acuerdo de tinción positiva o a un acuerdo de tinción negativa.

## Resultados de concordancia 2x2

En este análisis primario, los resultados de las dos pruebas (Bond Oracle HER2 IHC System y DAKO HercepTest) se clasificaron como negativos (0, 131+) o como positivos (2+, 3+). Las frecuencias con las que se obtuvieron las cuatro posibles combinaciones se muestran en un formato de tabla 2x2 (consulte la Tabla 6). A continuación, se calculó la tasa de concordancia global basada en esta tabla 2x2 y acompañada por un intervalo de confianza exacto del 95% (basado en la distribución binomial).

La hipótesis nula ( $H_0$ ), cuyos criterios de éxito se contraponen, es que la concordancia no sea superior al 75%.

El acuerdo observado en un análisis 2x2 de las 431 muestras analizadas entre las dos pruebas muestra una concordancia del 92,34% (398/431) con un IC 95% del 89,42% - 94,67%. Estos datos apoyan el rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que el acuerdo era que la concordancia no fuera superior al 75% con un valor  $p < 0,0001$ .

El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Bond Oracle HER2 IHC System para identificar correctamente los casos positivos del HercepTest (el porcentaje de muestras calificadas como positivas tanto en el Bond Oracle HER2 IHC System como en el HercepTest con respecto a todos los casos positivos del HercepTest) fue del 84,87% (129/152) con un IC 95% del 78,17% al 90,16%. El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente los casos negativos del HercepTest (el porcentaje de muestras calificadas como negativas tanto en el Bond Oracle HER2 IHC System como en el HercepTest con respecto a todos los casos negativos del HercepTest) fue del 96,42% (269/279) con un IC 95% del 93,51% al 98,27%.

		HercepTest		
		Negativo	Positivo	Totales
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo	269	23	292
	Positivo	10	129	139
	Totales	279	152	431

Concordancia 2x2 (IC 95%) = 92,34% (89,42 a 94,67%);  $p < 0,0001$

Tabla 8. Concordancia 2x2 del Bond Oracle HER2 IHC System con el HercepTest

### Resultados de concordancia 3x3

Los datos se agruparon como negativos (0 ó 1+), equívocos (2+) o positivos (3+) para el análisis 3x3 y mostraron una concordancia del 86,54% (373/431) con un IC 95% del 82,95% al 89,62%. Por tanto, la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que el acuerdo era que la concordancia no fuera superior al 75% fue rechazada con un valor  $p < 0,0001$ .

El porcentaje de acuerdo positivo para 3+ (el porcentaje de muestras calificadas como positivas 3+ tanto en el Bond Oracle HER2 IHC System como en el HercepTest con respecto a todos los casos positivos 3+ del HercepTest) en este estudio fue del 73,33% (66/90) con un IC 95% del 62,97% al 82,11%. El porcentaje de acuerdo negativo fue del 96,42% (269/279) con un IC 95% del 93,51% al 98,27%. Consulte la Tabla 7.

		HercepTest			
		Negativo (0 ó 1+)	2+	3+	Totales
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo (0 ó 1+)	269	23	0	292
	2+	10	38	24	72
	3+	0	1	66	67
	Totales	279	62	90	431

Concordancia 3x3 (IC 95%) = 86,54% (82,95 a 89,62%);  $p < 0,0001$

Tabla 9. Concordancia 3x3 del Bond Oracle HER2 IHC System con el HercepTest

En conclusión, los datos obtenidos en este estudio demuestran que el Bond Oracle HER2 IHC System se puede utilizar como una ayuda para la determinación del tratamiento con la terapia de Herceptin® (trastuzumab), gracias a su elevada concordancia con el HercepTest.

### Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System con el PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Mama

La segunda parte del estudio se diseñó para examinar la concordancia entre el Bond Oracle HER2 IHC System y el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, considerado como el "máximo estándar" para el análisis reflejo de evaluación genética utilizado junto con la inmunohistoquímica de HER2.

Este estudio se llevó a cabo en los mismos sitios de investigación y utilizó la misma cohorte de estudio que la primera parte. Todos los casos se tiñeron con el Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit conforme a las instrucciones del fabricante especificadas en el prospecto. Cortes secuenciales de cada caso se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND (empleado en la primera parte de este estudio clínico). De los 431 casos teñidos, en tres (3) no se obtuvo ningún resultado debido a la insuficiente hibridación de la sonda, por lo que la cohorte total fue de 428 casos.

En todos los portaobjetos teñidos, el grado de tinción fue determinado por observadores cualificados de los dos sitios de investigación. Para el análisis de concordancia 3x2, la tinción se interpretó como negativa si la relación de amplificación génica HER2/CEP17 era inferior a ( $<$ ) 2,0 y como positiva si era igual o superior a ( $>$ ) 2,0 tras un recuento de 20 células tumorales.

## Resultados de concordancia 3x2

El acuerdo observado en un análisis 3x2 de las 428 muestras analizadas entre las dos pruebas muestra una concordancia del 87,6% (375/428) con un IC 95% del 84% al 90%.

El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Bond Oracle HER2 IHC System para identificar correctamente los casos positivos del PathVysion (el porcentaje de muestras calificadas como positivas tanto en el Bond Oracle HER2 IHC System como en el PathVysion con respecto a todos los casos positivos del PathVysion) fue del 93,8% (61+30/97) con un IC 95% del 86,8% al 97,4%.

El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente los casos negativos del PathVysion (el porcentaje de muestras calificadas como negativas tanto en el Bond Oracle HER2 IHC System como en el PathVysion con respecto a todos los casos negativos del PathVysion) fue del 85,8% (284/331) con un IC 95% del 81,6% al 89,2%. Consulte la Tabla 10.

		PathVysion HER-2 DNA Probe Kit		
		Negativo	Positivo	Totales
Bond Oracle HER2 IHC System	0/1+	284	6	290
	2+	41	30	71
	3+	6	61	67
	Totales	331	97	428

Concordancia total (IC 95%) = 87,6% (84 al 90%)

*Tabla 10. Concordancia 3x2 de la tinción con el Bond Oracle HER2 IHC System con respecto al kit PathVysion HER-2 DNA Probe.*

## Concordancia clínica del Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Estómago

El objetivo de la tercera parte del estudio era generar datos de muestras de cáncer gástrico en estado avanzado con tejido fijado en formalina e incluido en parafina, para examinar la concordancia entre el Bond Oracle HER2 IHC System completamente automatizado en el sistema de tinción avanzado totalmente automatizado BOND mediante el Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. El criterio de aceptación para la tercera parte se definió como una concordancia global superior al 75% entre las dos pruebas.

Para el análisis de concordancia 2x2, la tinción se interpretó como negativa si la intensidad era de 0 o 1+ y como positiva si era de 2+ o 3+. Para el análisis de concordancia 3x3, la tinción se interpretó como negativa si la intensidad era de 0 o 1+, como equívoca si era de 2+ y como positiva si era de grado 3+. Asimismo se analizaron los datos para llegar a un acuerdo de tinción positiva o a un acuerdo de tinción negativa.

## Resultados - Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody - Estómago

### Resultados de concordancia 2x2

La concordancia entre el Bond Oracle HER2 IHC System completamente automatizado, mediante el sistema de tinción avanzado completamente automatizado BOND y el Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5), se llevó a cabo en las 287 preparaciones de muestra disponibles.

La concordancia observada entre las dos pruebas en un análisis 2x2 fue del 95,12 % (273/287) con un IC 95 % de 91,95 - 97,31 %. Estos datos apoyan el rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que el acuerdo era que la concordancia no fuera superior al 75% con un valor  $p < 0,0001$ . El porcentaje de acuerdo positivo (sensibilidad) o la capacidad del Bond Oracle HER2 IHC System para identificar correctamente las muestras positivas del ensayo del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (el porcentaje de muestras puntuadas como positivas tanto por el Bond Oracle HER2 IHC System como por el Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) entre todas las muestras positivas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) fue del 90,79 % (138/152) con un IC 95 % de 85,03 - 94,87 %. El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente las muestras negativas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (el porcentaje de muestras puntuadas como negativas tanto por el Bond Oracle HER2 IHC System como por el Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) entre todas las muestras negativas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) fue del 100 % (135/135) con un IC 95 % de 97,30 - 100 % (consulte la tabla 11).

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)		
		Negativo	Positivo	Totales
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo	135	14	149
	Positivo	0	138	138
	Totales	135	152	287

Concordancia total (95 % CI) = 95,12% (91,95 - 97,31 %)

Tabla 11. Concordancia 2x2 del sistema de tinción Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody en tejido gástrico.

## Resultados de concordancia 3x3

La concordancia observada entre las dos pruebas en un análisis 3x3 fue del 89,90 % (258/287) con un IC 95 % del 85,81 % al 93,13 %. Por tanto, la hipótesis nula ( $H_0$ ) de que el acuerdo era que la concordancia no fuera superior al 75% fue rechazada con un valor  $p < 0,0001$ . El porcentaje de acuerdo positivo para 3+ o la capacidad del Bond Oracle HER2 IHC System para identificar correctamente las muestras positivas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (el porcentaje de muestras puntuadas como 3+ tanto por el Bond Oracle HER2 IHC System como por el Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) entre todas las muestras positivas 3+ del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) en este estudio fue del 85,94 % (110/128) con un CI 95 % de 78,69 % a 91,45 %. El porcentaje de acuerdo negativo (especificidad) o la capacidad de la prueba para identificar correctamente las muestras negativas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) (el porcentaje de muestras puntuadas como negativas tanto por el Bond Oracle HER2 IHC System como por el Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) entre todas las muestras negativas del Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)) fue del 100 % (135/135) con un IC 95 % de 97,30 % a 100 %. Consulte la tabla 12.

		Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5)			
		Negativo (0 o 1+)	2+	3+	Totales
Bond Oracle HER2 IHC System	Negativo (0 o 1+)	135	11	3	149
	2+	0	13	15	28
	3+	0	0	110	110
	Totales	135	24	128	287

Concordancia total (IC 95 %) = 89,90 % (85,81 - 93,13 %)

*Tabla 12. Concordancia 3x3 del sistema de tinción Bond Oracle HER2 IHC System frente al Ventana Medical Systems Inc. PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody en tejido gástrico.*

## Inmunorreactividad – Panel normal

Tipo de tejido normal	Patrón de tinción	
	HER2 Primary Antibody	HER2 Negative Control
Adrenal	Negativo	Negativo
Cerebro, Cerebelo	Negativo	Negativo
Cerebro, Encéfalo	Negativo	Negativo
Mama	Negativo	Negativo
Médula ósea	Negativo	Negativo
Colon	Negativo	Negativo
Esófago	Negativo	Negativo
Ojo	Negativo	Negativo
Hipófisis	Tinción citoplasmática moderada observada en células hipofisarias (1/3)	Negativo
Riñón	Negativo	Negativo
Laringe	Negativo	Negativo
Hígado	Negativo	Negativo
Pulmón	Negativo	Negativo
Mesotelio	Negativo	Negativo
Ovario	Negativo	Negativo
Páncreas	Negativo	Negativo
Paratiroides	Negativo	Negativo
Nervio periférico	Negativo	Negativo
Próstata	Negativo	Negativo
Glándula salivar	Negativo	Negativo
Piel	Negativo	Negativo
Intestino delgado	Negativo	Negativo
Bazo	Negativo	Negativo
Estómago	Tinción citoplasmática leve observada en células gástricas (2/3)	Negativo
Músculo estriado	Negativo	Negativo
Testículo	Negativo	Negativo
Timo	Negativo	Negativo
Tiroides	Negativo	Negativo
Amígdalas	Negativo	Negativo
Cérvix uterino	Negativo	Negativo
Útero	Negativo	Negativo

Tabla 13. Tinción del panel normal



## Estudio de reproducibilidad

### Prueba de precisión intraciclo e interciclo

La prueba de precisión se llevó a cabo en Leica Biosystems, Newcastle Ltd. El tejido utilizado fue un microarray tisular (TMA) compuesto fijado con formalina e incluido en parafina suministrado por Isu Abxis (Yonsei University Medical Center 134 Shinchon-dong, Seoul, 120-752 Korea) y formado por 20 estructuras de tejido de carcinoma mamario invasivo de 4 mm de diámetro. Los 20 casos se seleccionaron en función de los grados HER2 previamente asignados. Sobre esta base, se incluyeron 5 casos de HER2 3+, 5 casos de HER2 2+, 5 casos de HER2 1+ y 5 casos de HER2 0.

#### A. Prueba de precisión intraciclo

La prueba de precisión intraciclo del Bond Oracle HER2 IHC System se evaluó sobre un total de 40 cortes consecutivos tomados de un TMA formado por 20 portaobjetos de tumores mamarios invasivos y 40 HER2 Control Slides. Todos los portaobjetos se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND. Los cortes se tiñeron durante un periodo continuo usando un Bond Oracle HER2 IHC System del mismo lote de fabricación. Los cortes teñidos fueron enmascarados y evaluados de forma aleatoria por un único observador experimentado para determinar la precisión intraciclo.

Una evaluación de los portaobjetos indicó que se podían interpretar 733/800 (91,63%) puntos de datos de prueba. 40 puntos de datos se excluyeron debido a la presencia de DCIS únicamente, mientras que otros 27 puntos de datos no pudieron ser interpretados debido a una pérdida de tumor invasivo (específico para 3 estructuras). La variación en la tinción se produjo en 61 (8,32%) de los 733 eventos de tinción posibles. En 37 de ellos, las variaciones observadas fueron de grado 3+ a grado 2+ (n = 20) y de grado 1+ a grado 0 (n = 17) y, como tales, no supusieron un cambio de clínicamente positivo a clínicamente negativo o viceversa en una evaluación de datos 2x2. Los 24 (3,27%) casos restantes de variación de tinción sí supusieron un cambio de clínicamente negativo (0 ó 1+) a clínicamente positivo (2+ ó 3+). Valor de aprobación = 96,7% (IC 95% = 95,15% a 97,81%).

#### B. Prueba de precisión interciclo

La prueba de precisión interciclo del Bond Oracle HER2 IHC System se evaluó sobre un total de 24 cortes consecutivos tomados de un TMA formado por 20 portaobjetos de tumores mamarios invasivos y 24 HER2 Control Slides. Todos los portaobjetos se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND. Los portaobjetos se evaluaron en 8 ciclos independientes, ejecutados en el mismo laboratorio y en tres ocasiones diferentes usando un Bond Oracle HER2 IHC System del mismo lote de fabricación. Los portaobjetos teñidos fueron enmascarados y evaluados de forma aleatoria por un único observador experimentado para determinar la precisión interciclo.

Una evaluación de los portaobjetos indicó que se podían interpretar 456/480 (95,00%) puntos de datos de prueba. 24 puntos de datos no pudieron ser interpretados debido a una pérdida de tumor invasivo (específico para 5 estructuras). La variación en la tinción se produjo en 42 (9,21%) de los 456 puntos de datos posibles. En 30 de ellos, las variaciones observadas fueron de grado 3+ a grado 2+ (n = 10) y de grado 1+ a grado 0 (n = 20) y, como tales, no supusieron un cambio de clínicamente positivo a clínicamente negativo o viceversa en una evaluación de datos 2x2. Los 12 (2,63%) casos restantes de variación de tinción sí supusieron un cambio de clínicamente negativo (0 ó 1+) a clínicamente positivo (2+ ó 3+). Valor de aprobación = 97,37% (IC 95% = 95,90% a 98,77%).

## C. Reproducibilidad entre lotes

Para determinar la reproducibilidad entre lotes se fabricaron 3 lotes de Bond Oracle HER2 IHC System conforme a las NCF (Normas de Correcta Fabricación) en 3 ocasiones diferentes y dichos lotes de evaluaron con 24 cortes de tumor mamario (24 puntos de datos de prueba) tomados de cuatro bloques tisulares diferentes fijados con formalina e incluidos en parafina (que representaban las intensidades de tinción HER2 de grado 0, 1+, 2+ y 3+) y tres HER2 Control Slides (12 puntos de datos de control). Los tres ciclos independientes se ejecutaron en el mismo laboratorio y en tres ocasiones diferentes usando lotes de fabricación diferentes del Bond Oracle HER2 IHC System. Todos los portaobjetos se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND. Los portaobjetos teñidos fueron enmascarados y evaluados de forma aleatoria por un único observador cualificado para determinar la reproducibilidad entre lotes.

Una evaluación de los portaobjetos (de prueba y de control) indicó que se podían interpretar 36/36 puntos de datos. No se produjo variación en la tinción en ninguno de los 36 puntos de datos de los tres lotes de fabricación diferentes del Bond Oracle HER2 IHC System. Por tanto, la tinción con el Bond Oracle HER2 IHC System es consistente en los diferentes lotes de fabricación.

## D. Reproducibilidad entre laboratorios

La prueba de reproducibilidad entre laboratorios del Bond Oracle HER2 IHC System se evaluó en 3 sitios: Leica Biosystems Newcastle (Sitio A) y dos laboratorios independientes (Sitios B y C) sobre un total de 192 cortes tomados de un TMA formado por 20 portaobjetos de tumores mamaros invasivos y 24 HER2 Control Slides. De los 192 cortes de TMA teñidos, 96 se tiñeron con el HER2 Primary Antibody y 96 con el reactivo de HER2 Negative Control. Todos los portaobjetos se tiñeron con el Bond Oracle HER2 IHC System instalado en un sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND. Los portaobjetos se evaluaron en 8 ciclos independientes, ejecutados en cada uno de los 3 sitios diferentes usando un Bond Oracle HER2 IHC System del mismo lote de fabricación. Los portaobjetos teñidos fueron enmascarados y evaluados de forma aleatoria en Leica Biosystems, Newcastle por un único observador experimentado para determinar la reproducibilidad entre laboratorios.

Una evaluación de los portaobjetos indicó que se podían interpretar 1477/1920 (76,93%) puntos de datos de prueba. 443 puntos de datos de prueba no pudieron ser interpretados debido a:

- a) Inadecuado rendimiento del portaobjetos de control HER2 en 2/24 ocasiones, provocando la retirada del estudio de 2 ciclos/160 puntos de datos de prueba. Este evento se produjo una vez en el Sitio A y una vez en el Sitio B (80 puntos de datos de prueba retirados del estudio en cada sitio).
- b) Desviación del plan de prueba en el Sitio C, en el que 24 portaobjetos en total se sometieron a contratinción manual con hematoxilina tras la tinción con el Bond Oracle HER2 IHC System. Esto provocó una excesiva contratinción de los portaobjetos de control HER2 y de los puntos de datos de prueba del TMA, provocando la retirada del estudio de 240 puntos de datos.
- c) Pérdida de tumor invasivo que provocó la retirada del estudio de 23 puntos de datos de prueba. Este evento se produjo en 23 ocasiones en el Sitio A y fue el resultado directo de la pérdida de tejido en el bloque del TMA durante la obtención de los 192 cortes de TMA consecutivos necesarios para completar esta prueba.
- d) Tinción no interpretable debido a un inadecuado lavado por parte del sistema de tinción avanzado y totalmente automatizado BOND, provocando la retirada del estudio de 20 puntos de datos.

Una evaluación de los portaobjetos interpretables indicó que la variación en la tinción se produjo en 79 (5,28%) de los 1477 eventos de tinción posibles. De ellos, 14/1477 (0,95%) presentaron variaciones de grado 0 a grado 1+ o de grado 2+ a grado 3+, como tales, no supusieron un cambio de clínicamente positivo a clínicamente negativo o viceversa en una evaluación de datos 2x2. Valor de aprobación = 99,05% (IC 95% = 98,42% a 99,46%). De

estos 14 eventos de variación de tinción, 5/1477 (0,34%) se produjeron en Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Sitio A), 8/1477 (0,54%) se produjeron en el Sitio B y 1/1477 (0,07%) se produjo en el Sitio C.

Los 65/1477 (4,40%) eventos de variación de tinción restantes mostraron variaciones de grado 2+ a grado 1+ o de grado 2+ a grado 0 y, como tales, supondrían un cambio de clínicamente positivo a clínicamente negativo o viceversa en una evaluación de datos 2x2. Valor de aprobación = 95,6% (IC 95% = 94,42% a 96,54%). De estos 65 cambios clínicamente significativos, 11/65 (16,9%) se produjeron en Leica Biosystems, Newcastle, Ltd (Sitio A), 24/65 (36,9%) se produjeron en el Sitio B y 30/65 (46,1%) se produjeron en el Sitio C. Ninguno de los cambios clínicamente significativos supuso un cambio de grado 3+ a resultado negativo (0 ó 1+) o viceversa.

## E. Reproducibilidad entre observadores

40 casos de cáncer mamario invasivo seleccionados de forma aleatoria, con una distribución equitativa de cada uno de los grados HER2 IHC (muestras de resección) fueron cortados de forma consecutiva y suministrados a Leica Biosystems, Newcastle (Sitio A), al Sitio B y al Sitio C para su tinción e interpretación. Los cortes se enmascararon y aleatorizaron en cada sitio antes de determinarse su intensidad de tinción. El acuerdo de reproducibilidad entre observadores entre los dos sitios clínicos independientes, Sitio B y Sitio C, fue del 87,5% (IC 95% = 73,3% a 95,8%). Por otro lado, el acuerdo entre el Sitio B y el Sitio C y Leica Biosystems Newcastle, Ltd fue del 92,5% (IC 95% = 79,6% a 98,4%) y del 85% (IC 95% = 70,1% a 94,29%), respectivamente. El análisis de la concurrencia total entre los tres observadores (A, B, C) es del 82,50%.

## F. Precisión entre instrumentos (BOND-MAX vs. BOND-III)

La prueba de precisión entre instrumentos usando el Bond Oracle HER2 IHC System se llevó a cabo en un único sitio de investigación europeo independiente. Las muestras analizadas se obtuvieron de cortes completos fijados con formalina e incluidos en parafina de ciento treinta y ocho (138) casos de cáncer mamario invasivo (muestras de resección y muestras obtenidas por punción). La prueba de precisión entre instrumentos se llevó a cabo de forma prospectiva dentro del sitio investigacional, tiñendo cortes consecutivos en las plataformas BOND-MAX y BOND-III. Tres (3) casos se consideraron inadecuados debido a disponibilidad de la muestra/tumor y fueron retirados del estudio.

En cada uno de los instrumentos se utilizaron reactivos complementarios del Bond Oracle HER2 IHC System y del BOND con los mismos números de lotes. Las secciones se tiñeron retrospectivamente. Los portaobjetos fueron interpretados en el sitio de investigación por un único observador experimentado para determinar la precisión entre instrumentos.

Una evaluación de dichos portaobjetos mostró una concordancia 2x2 entre tinción positiva (2+, 3+) y negativa (0, 1+) del 94,2% (130/138) con un IC 95% del 88,9 al 97,5% y una concordancia 3x3 entre tinción positiva (3+), equívoca (2+) y negativa (0, 1+) del 87,0% (120/138) con un IC 95% del 80,2 al 92,1%.

		BOND-MAX		
		Negativa (0/1+)	Positiva (2/3+)	Totales
BOND-III	Negativa (0/1+)	80	1	81
	Positiva (2/3+)	7	50	57
	Totales	87	51	138

Concordancia total (IC 95%) = 94,2% (88,9 al 97,5%)

Tabla 14. Concordancia 2x2 de la tinción con el Bond Oracle HER2 IHC System en plataformas BOND-MAX vs. BOND-III.

		BOND-MAX			
		Negativa (0/1+)	Equívoca (2+)	Positiva (3+)	Totales
BOND-III	Negativa (0/1+)	80	1	0	81
	Equívoca (2+)	6	5	1	12
	Positiva (3+)	1	9	35	45
	Totales	87	15	36	138

Concordancia total (IC 95%) = 87,0% (80,2 al 92,1%)

Tabla 15. Concordancia 3x3 de la tinción con el Bond Oracle HER2 IHC System en plataformas BOND-MAX vs. BOND-III.

En conclusión, los datos generados en este estudio demuestran un elevado nivel de concordancia entre los sistemas Leica Biosystems' BOND-MAX y BOND-III cuando se evalúan utilizando el Bond Oracle HER2 IHC System.

## Solución de problemas

Problema	Causa probable	Acción correctora
No hay tinción inmunohistoquímica	Ciclo abortado antes de completarse	Usando el software BOND, confirme la presencia de cualquier error notificable durante el ciclo de tinción y siga las instrucciones del software BOND para solucionarlo.
	Elección incorrecta del protocolo	Compruebe que el campo "Staining protocol" del cuadro de diálogo "Add slide" muestra el protocolo predeterminado <b>"*IHC Protocol H"</b> .
	Inadecuada desparafinización de los portaobjetos	Compruebe que el modo <b>"*Dewax"</b> está seleccionado en el campo "Preparation" del cuadro de diálogo "Add slide".
	Se han dispensado reactivos a granel inadecuados	Compruebe que todos los reactivos BOND han sido asignados a los envases a granel apropiados y que están colocados en las posiciones apropiadas del instrumento.
	Contaminación de la BOND Wash Solution con azida sódica	Use una BOND Wash Solution recién preparada a la dosis de trabajo apropiada.
Leve tinción inmunohistoquímica específica	Inadecuada recuperación del epítipo	Compruebe que se han asignado los reactivos de BOND Epitope Retrieval adecuados a los envases a granel correctos y que el software BOND ha incluido por defecto el protocolo de recuperación del epítipo adecuado, <b>*HIER 25 min with *ER1 (97)</b> .
	Inadecuada fijación o procesamiento de la muestra de prueba	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando.
	El Bond Oracle HER2 IHC System se está utilizando fuera de la fecha de caducidad	Compruebe que el Bond Oracle HER2 IHC System se está utilizando dentro de la fecha de caducidad especificada.
Excesiva tinción inmunohistoquímica específica	Inadecuada recuperación del epítipo	Compruebe que se han asignado los reactivos de BOND Epitope Retrieval adecuados a los envases a granel correctos y que el software BOND ha incluido por defecto el protocolo de recuperación del epítipo <b>*HIER 25 min with ER1 (97)</b> .
	Variaciones en la fijación	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando. Si es posible, vuelva a analizar ese caso usando otro bloque. Si esto no es posible, evalúe las áreas que muestran los mejores patrones de fijación junto con un corte teñido H&E correspondiente.

Problema	Causa probable	Acción correctora
Tinción inespecífica de fondo	Se han dispensado reactivos a granel inadecuados	Compruebe que todos los reactivos BOND han sido asignados a los envases a granel apropiados y que están colocados en las posiciones apropiadas del instrumento.
	Inadecuada desparafinización de los portaobjetos	Compruebe que el modo " <b>*Dewax</b> " está seleccionado en el campo "Preparation" del cuadro de diálogo Add slide.
	Reacción cruzada inmunohistoquímica inespecífica en el tejido	Consulte la descripción de la reactividad cruzada del tejido normal en el Bond Oracle HER2 IHC System (consulte la Tabla 13).
	Reacción cruzada inmunohistoquímica inespecífica en áreas de necrosis tisular	Compruebe que se ha utilizado un fijador a base de formalina y que los programas de procesamiento son adecuados para la muestra que se está analizando. Si es posible, vuelva a analizar ese caso usando otro bloque. Si esto no es posible, evalúe las áreas que muestran los mejores patrones de fijación junto con un corte teñido H&E correspondiente.
	Artefacto de secado tras la finalización de un ciclo de tinción	Si los portaobjetos se van a incluir en un ciclo nocturno, se recomienda el uso de la funcionalidad de arranque retardado del BOND. Compruebe que existe un volumen adecuado de agua destilada o desionizada disponible para dispensarlo sobre los portaobjetos durante este periodo de tiempo para así garantizar que los portaobjetos no se sequen.
Cortes adheridos a los portaobjetos con ayuda de aditivos de almidón	Use portaobjetos sin almidón (Leica BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040).	
Tejido desprendido del (de los) portaobjetos de paciente/control	Uso del tipo incorrecto de portaobjetos o del drenaje inadecuado del corte	Compruebe que se están utilizando los portaobjetos apropiados para los cortes de paciente/control (Leica BOND Plus Slides – código de producto S21.2113 o Apex BOND Slides - código de producto 3800040). Compruebe que los portaobjetos reciben el adecuado drenaje y que se incuban durante 12–18 horas a 37 °C (toda la noche). Los cortes que requieran una adherencia adicional pueden incubarse a 60 °C durante una hora más.

Tabla 16. Bond Oracle HER2 IHC System Trouble Shooting Guide.

Si surgen problemas asociados al Bond Oracle HER2 IHC System que no se incluyen en la guía de resolución de problemas (consulte la Tabla 16), póngase en contacto con el Departamento de Servicio Técnico local o con su Distribuidor local de Leica Biosystems' para solicitar asistencia.

## Referencias

1. Corbett IP, Henry JA, Angus B 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. *Journal of Pathology* 1990; 161:15-25.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992-1003.
3. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O et. al. Pathological features of advanced gastric cancer(GC): relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:15s, (Abstr 4556).
4. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy resultst from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509
5. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285-9.
6. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165-72.
7. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255-63.
8. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825-31.
9. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies: Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1967; 14: 929-931.
10. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International* 1995; 45(2): 108-115.
11. Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AN, Jasani B, Miller K and Pinder SE. HER2 Testing in the UK- Further Update To Recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2008.
12. Bang YJ et al. Poster 4526 presented at the 44th ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, USA, 30 May–3 June 2008.
13. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805.
14. M. Tanner, M. Hollmén, T. T. Junttila, A. I. Kapanen, S. Tammola, Y. Soini, H. Helin, J. Salo, H. Joensuu, E. Sihvo, K. Elenius, and J. Isola. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II $\alpha$  gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology* (February 2005) 16(2): 273-278.
15. Dickson, RB and Lippman, ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1992.
16. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1990; 17: 234-247.
17. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087-1898: USA
18. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, et al. Special Report: Quality control in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1989 ;92: 836-843.
19. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1990; 5: 953-62.

20. Hoffman M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van der Vijver M, Kim W et. al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805
21. Nadjji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry 2007* (ed. Renshaw S), PP 205-237. Scion Publishing Ltd.
23. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology* 1980; 73: 626-32.
24. Bartlet JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology* 2006.

### Correcciones a la publicación anterior

Componentes suministrados, Identificación de símbolos.

### Fecha de emisión

16 de julio de 2020

### Identificación de símbolos

	Código de lote		Almacenamiento		Referencia
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro		Fabricante		Frágil
	eIFU - consulte las instrucciones de uso		Contiene suficiente para <n> pruebas		Usar hasta AAAA-MM-DD
<b>SN</b>	Número de serie	<b>R<sub>X</sub> Only</b>	Solo con receta		

HercepTest™ es una marca comercial de, y sujeta a licencias de, DakoCytomation, Denmark A/S. Herceptin® es una marca comercial de Genentech, Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd.