



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000458-23-3

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-000458-23-3 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, denominado: Nombre descriptivo: 1) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 2) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1); 3) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 4) Pathway anti-Her-2/neu (4B5); 5) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9); 6) CONFIRM TM anti-p53 (DO-7); 7) Anti-p53 (Bp53-11); 8) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1).

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

LA ADMINISTRADORA NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL
DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro, denominado: Nombre descriptivo: 1) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 2) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1); 3) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 4) Pathway anti-Her-2/neu (4B5); 5) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9); 6) CONFIRM TM anti-p53 (DO-7); 7) Anti-p53 (Bp53-11); 8) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1), de acuerdo con lo solicitado por Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízanse los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2024-16723134-APN-DVPCYAR#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 740-852 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbese en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: 1) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 2) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1); 3) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 4) Pathway anti-Her-2/neu (4B5); 5) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9); 6) CONFIRM TM anti-p53 (DO-7); 7) Anti-p53 (Bp53-11); 8) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1)

Marca comercial: VENTANA.

Modelos:

- 1) (N° de catálogo Roche: 05278392001, N° de catálogo Ventana: 790-4296) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 2) (N° de catálogo: 05278414001, N° de catálogo Ventana: 790-4325) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 3) (N° de catálogo: 05277990001, N° de catálogo Ventana: 790-2223) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 4) (N° de catálogo: 05278368001, N° de catálogo Ventana: 790-2991) Pathway anti-Her-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 5) (N° de catálogo: 05278384001, N° de catálogo Ventana: 790-4286) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 6) (N° de catálogo: 05278775001, N° de catálogo Ventana: 800-2912) CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody.
- 7) (N° de catálogo: 05267102001, N° de catálogo Ventana: 760-2542) Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody.
- 8) (N° de catálogo: 05278406001, N° de catálogo Ventana: 790-4324) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Indicación/es de uso:

1) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

2) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

3) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

4) Anticuerpo monoclonal de conejo destinado a su uso en laboratorio para la detección semicuantitativa del

antígeno HER2 en secciones de tejido normal y neoplásico fijado con formol y embebido en parafina con una tinción posterior mediante un instrumento BenchMark IHC/ISH. Está indicado como ayuda para la evaluación de pacientes con cáncer de mama para las que se está planteando la aplicación de un tratamiento con Herceptin® (trastuzumab) o KADCYLA® (adotrastuzumab emtansina).

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

5) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina teñido con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

6) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

7) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH.

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

8) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Forma de presentación: 1) a 2) Envases por 250 determinaciones, conteniendo: un dispensador x 25 ml de anticuerpo

3) a 8) Envases por 50 determinaciones, conteniendo: un dispensador x 5 ml de anticuerpo.

Período de vida útil y condición de conservación: 1) a 3) y 5) a 8) 24 (VEINTICUATRO) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 - 8 °C.

4) 18 (DIECIOCHO) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 - 8 °C.

Nombre del fabricante:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.

Lugar de elaboración:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. 1910 East Innovation Park DR. Tucson, AZ USA, 85755.

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Expediente N° 1-0047-3110-000458-23-3

N° Identificadorio Trámite: 45722

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta María
Date: 2024.03.01 16:08:15 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

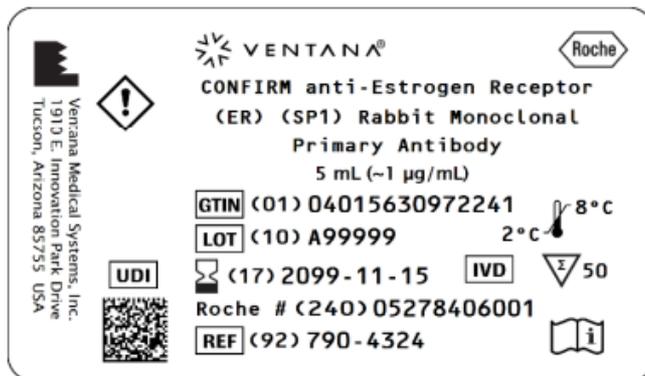
Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.03.01 16:08:17 -03:00

PROYECTO DE ROTULO

- 1- CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N°de catálogo: 05278392001)



- 2- CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N° de catálogo: 5278406001)

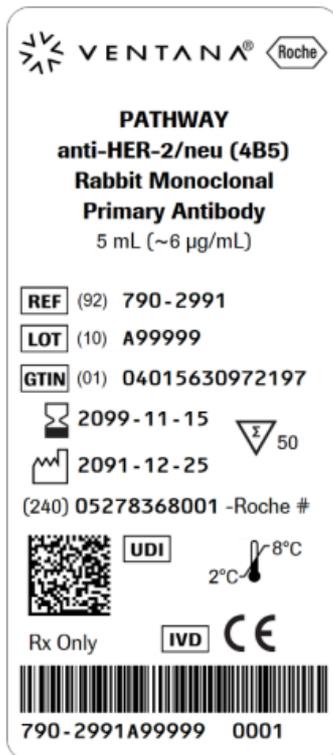


Farm. ROBERTA M.F.L. MAZZA
PRODUCOS ROCHE S.A. de I.
Division Diagnostico
DT & APODERADA LEGAL

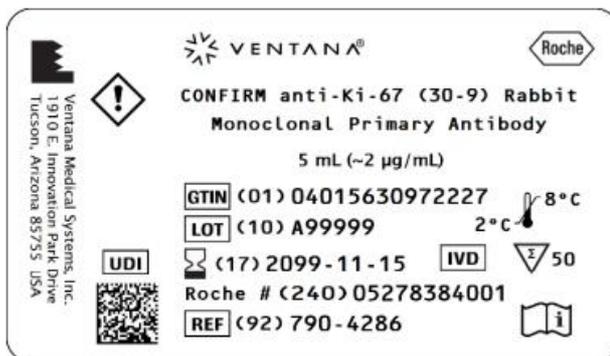
- 3- CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N°de catálogo: 5277990001)



4- PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N° de catálogo: 05278368001)



5- CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N° de catálogo: 05278384001)



Farm. ROBERTA MILE MAZZA
PRODUCES ROCHE S.A. de I.
Division Diagnostica
DT & APODERADA LEGAL

6- CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody (N° de catálogo: 05278775001)

 **CONFIRM**
anti-p53 (DO-7)
Primary Antibody
5 mL (~0.5 µg/mL)

REF (92) 800-2912
LOT (10) A99999
GTIN (01) 04015630971985

 2099-11-15  50
 2091-12-25
(240) 05278775001 -Roche #

 **UDI**  8°C
2°C

Rx Only **IVD**  0123


800-2912A99999 0001

7- Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody (N° de catálogo: 05267102001)

 **Anti-p53 (Bp53-11)**
Primary Antibody
5 mL (~2.5 µg/mL)

REF (92) 760-2542
LOT (10) A99999
GTIN (01) 04015630971015

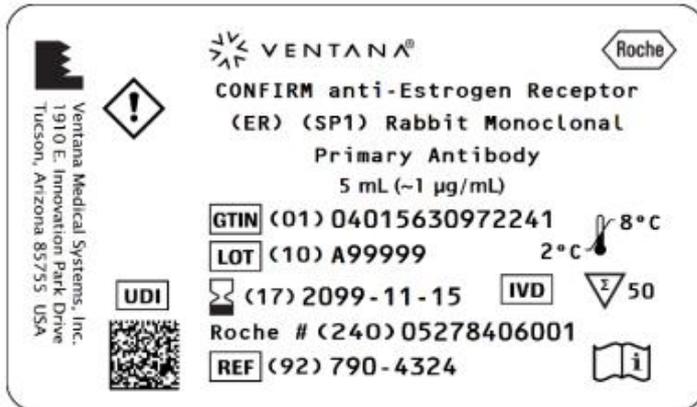
 2099-11-15  50
 2091-12-25
(240) 05267102001 -Roche #

 **UDI**  8°C
2°C

Rx Only **IVD**  0123


760-2542A99999 0001

8- CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (N° de catálogo: 05278406001)



DT.: Farm. R. Mele Mazza.
Productos Roche S.A.Q. e I.
(División Diagnóstica).
Otto Krause 4211 (CP1667)
Bs As, Arg. Producto autorizado
por ANMAT PM-740-852
Uso profesional exclusivo

Farm. ROBERTA MELE MAZZA
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I.
División Diagnóstica
DT & APODERADA LEGAL

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-2223  50

05277990001

REF 790-4296  250

05278392001

IVD

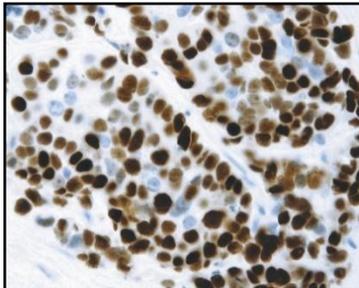


Figura 1. Tinción del carcinoma ductal de mama con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)

USO PREVISTO

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal (IgG) Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de

progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Uso exclusivo con receta médica.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)) es un anticuerpo monoclonal de conejo que detecta las isoformas A y B del receptor de progesterona humana (PR). El inmunógeno se ha desarrollado a partir de un péptido sintético identificado como una zona de elevada antigenicidad potencial común a las formas A y B del receptor de progesterona. El péptido se ha sintetizado y se ha unido de forma covalente con la hemocianina de lapa de ojo de cerradura para aumentar su antigenicidad. Se ha demostrado que el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) reacciona con las proteínas 60 kD, 87 kD y 110 kD de las células T47D mediante la técnica Western blotting. El tamaño de las proteínas concuerda con el peso molecular previsto de las formas A, B y C del receptor de progesterona.¹

El PR es un receptor de hormonas nuclear codificado por un solo gen (PGR).^{1,2} La actividad del PR se regula mediante el receptor de hormonas nuclear estrechamente asociado a él: el receptor de estrógeno (ER). Las acciones coordinadas del ER y PR estimulan el desarrollo normal de la glándula mamaria y son necesarias para la diferenciación y la proliferación en el epitelio adulto de mama.^{1,2,3}

El cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres.⁴ El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad depende de su detección precoz junto con una estrategia de tratamiento adecuada basada en factores pronósticos y predictivos.^{5,6} La evaluación diagnóstica que se adopta en los casos de cáncer de mama comprende una combinación del reconocimiento físico, las técnicas de imagen y la valoración anatomopatológica.⁵

El ER es un modelo de marcador tumoral que sirve para el control de pacientes con cáncer de mama. Las directrices clínicas y las pautas de las prácticas recomendadas indican que el estado del ER se debe evaluar en todos los casos de cáncer de mama primario invasivo para identificar a las pacientes que tienen más probabilidades de

responder a los tratamientos de tipo endocrino.^{5,6} Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno bloquean el crecimiento del cáncer inducido por el estrógeno moderando la hiperactividad del ER y se utilizan en terapias endocrinas en pacientes que presentan una sobreexpresión del receptor.^{6,7}

En la práctica, casi la mitad de las pacientes positivas en ER no respondieron al tratamiento endocrino, un fenómeno asociado a la transformación maligna del receptor en lesiones cancerosas.⁸ La sobreexpresión del PR puede servir para caracterizar aún más el tumor de mama y predecir la respuesta al tratamiento, ya que actúa como detector en la evaluación del estado funcional del ER.^{8,9} En 1975 se estableció la hipótesis de que la sobreexpresión del PR puede actuar como un marcador predictivo de la respuesta a la terapia endocrina.⁸ Los estudios que se llevaron a cabo posteriormente confirmaron el valor del PR en las predicciones y el pronóstico.^{10,11} Un nivel más elevado de la expresión del PR puede indicar una respuesta más eficaz a la terapia endocrina.¹⁰

La detección del PR es el pilar fundamental en el que se sostiene el control de las pacientes con carcinoma de mama invasivo.^{5,6,9} Las directrices y las prácticas recomendadas hacen hincapié en que la inmunohistoquímica (IHC) es el método más adecuado para detectar el PR en el cáncer de mama.⁹ Por lo tanto, la detección mediante IHC del PR con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) puede servir de ayuda a la hora de controlar, pronosticar y predecir el resultado del tratamiento del carcinoma de mama.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se une al PR en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecte inmunoglobulinas de conejo, seguida de la incorporación de un conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) estreptavidina (VIEW DAB Detection Kit) o mediante un conjugado de anticuerpo secundario y peroxidasa de rábano (HRP) (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática.

Los casos clínicos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o de útero positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2), se debe teñir un segundo portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción nuclear de las células tumorales o de las glándulas uterinas y el estroma. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portaobjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama negativo en PR) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) (n.º cat. 790-2223) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) contiene aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno PR humano.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) (n.º cat. 790-4296) contiene reactivo suficiente para 250 pruebas.

Un dispensador de 25 mL de anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) contiene aproximadamente 25 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno PR humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón formado por Tris-HCl con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.1 %, un conservante. Existen trazas (~0.2 %) de suero bovino fetal con origen en Estados Unidos de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 1 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) es un anticuerpo monoclonal de conejo producido como sobrenadante de cultivo celular.

Consulte en la hoja de datos correspondiente del kit de detección de VENTANA las descripciones detalladas de: Principio del procedimiento, Material y métodos, Recogida y

preparación de muestras para análisis, Procedimientos de control de calidad, Resolución de problemas, Interpretación de los resultados y Limitaciones.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. View DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001)
5. Endogenous Biotin Blocking Kit (n.º cat. 760-050 / 05266092001)
6. ultraView Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning 1 (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH
16. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. Para procesar las muestras, se recomienda seguir los pasos que aparecen a continuación.¹²

Coloque la muestra en formol tamponado neutro al 10 %. La cantidad usada es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C).

Después de la fijación, la muestra debe colocarse en un instrumento de procesamiento de tejidos para prepararla durante la noche. En resumen, el proceso consiste en deshidratar la muestra con alcoholes y, a continuación, eliminar estos mediante reactivos de aclarado para finalmente llevar a cabo la infiltración con parafina.

Las muestras se emben en parafina en casetes de tejido y se cortan secciones de aproximadamente 4 µm de grosor que se centran y se recogen en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. El tejido deberá dejarse secar al aire colocando los portaobjetos a temperatura ambiente durante la noche o en un horno a 60 °C durante 30 minutos.

Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
3. Solo para uso profesional.
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
6. Este producto contiene un 1 % de suero bovino o una cantidad menor, que se utiliza en la producción del anticuerpo.
7. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
8. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{13,14}
9. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
10. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
11. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en dialog.roche.com.
12. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
13. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
14. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Normativa (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
 Advertencia	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
	P273	Evitar su emisión al medio ambiente.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, masa reactiva de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte Tabla 2 y Tabla 3 para ver los protocolos de tinción recomendados.

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con número de referencia 790-4509 o 790-4296.

La verificación y validación de los protocolos de tinción recomendados en cada kit de detección se demuestran mediante las pruebas de control de diseño y los resultados de estudios clínicos.

Cualquier modificación que se realice en los procedimientos de tinción recomendados anulará las características de rendimiento que se suministran en esta hoja de datos. El usuario deberá validar todas las modificaciones que realice en el procedimiento de tinción recomendado.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con *ultraView Universal DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

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

Tabla 3. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con *MIEW DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Estándar
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Bloque A/B (Bloqueador de biotina)	Necesario	Necesario
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de tejido positivo

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos y los instrumentos, y no como ayuda para

establecer un diagnóstico específico de las muestras de prueba. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Es necesario incluir un control de tejido positivo en cada sesión de procedimiento de tinción que se lleve a cabo. El CAP recomienda que el control de tejido positivo se encuentre en el portaobjetos de la paciente.⁹ Como ejemplo de control de tejido positivo para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se encuentra el carcinoma de mama positivo débil. Las células o componentes de tejido con tinción positiva (tinción nuclear de células tumorales) se utilizan para confirmar que el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se ha aplicado y que el instrumento ha funcionado correctamente. El tejido de control puede contener células o elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra extraída recientemente de autopsia, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se utilizarán para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actuará como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos.

Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. La opción más idónea es elegir un tejido de carcinoma de mama, que se caracteriza por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC.

Si no es posible, se puede utilizar endometrio proliferativo normal humano como control positivo. Los componentes de tinción positiva son la tinción nuclear de epitelios glandulares y células estromales y de músculo liso. Es posible, no obstante, que la tinción del tejido endometrial no sea lo suficientemente débil para detectar niveles bajos de degradación de los reactivos o problemas con la metodología IHC.

Control tisular negativo

Con un control tisular que se haya fijado, procesado y embebido de la misma forma que las muestras del paciente se puede verificar en cada sesión de tinción la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) para detectar el PR, así como proporcionar una indicación sobre una tinción de fondo específica (falsos positivos en la tinción). Además, incluir una variedad de tipos de células diferentes en la mayor parte de las secciones de tejido puede servir como control negativo para comprobar las especificaciones de rendimiento del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2). Por ejemplo, el mismo tejido (endometrio) que se utiliza como control de tejido positivo puede servir como control de tejido negativo. Los componentes que no van a tener tinción, como el citoplasma y la membrana celular, deberían mostrar la ausencia de una tinción específica en aquellas células que no está previsto que se tiñan, facilitando una indicación sobre la tinción de fondo específica. El control de tejido negativo también puede servir de ayuda en la interpretación de los resultados. La variedad de los diferentes tipos de células presentes en la mayor parte de las secciones de tejido suele ofrecer puntos de control negativo, pero es necesaria su comprobación por parte del usuario. Si se presenta una tinción específica en los puntos de control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

Control de reactivo negativo

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. El control de reactivo negativo se utiliza en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica y permitir que se interprete de forma más precisa la tinción específica en el sitio del antígeno. Todo ello indica la tinción de fondo no específica en cada portaobjetos. En lugar del anticuerpo primario, tñe el portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig, una IgG purificada de conejo no inmune que no reacciona con muestras humanas. Si se utiliza un control de reactivo negativo diferente, dilúyalo con VENTANA Antibody Diluent en la misma proporción de dilución que el antisuero del anticuerpo primario. En el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) existe una retención de aproximadamente el 0.2 % de suero bovino fetal. También se considera adecuada la incorporación de un 0.2 % de suero bovino fetal al VENTANA Antibody Diluent para usarlo como control de reactivo negativo no específico. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, la presencia de un control de reactivo negativo en un portaobjetos puede servir como control de fondo de unión no específica o negativa de otros anticuerpos.

Verificación del ensayo

Antes de usar por primera vez el anticuerpo en un procedimiento diagnóstico, o ante un cambio de lote, es necesario comprobar la especificidad del anticuerpo llevando a cabo una tinción de varios tejidos negativos y positivos cuyas características de rendimiento se conocen de antemano. Consulte los procedimientos de control de calidad que se han mencionado previamente en esta sección del prospecto y las recomendaciones de control de calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, la Anatomic Pathology Checklist o la CLSI Approved Guideline, o todos los documentos.^{16,17} Estos procedimientos de control de calidad deberían repetirse cada vez que se utilice un lote de anticuerpo nuevo, cuando se cambie el número de lote de uno de los reactivos del conjunto correspondiente o se modifiquen los parámetros del ensayo. El control de calidad no se puede llevar a cabo de forma significativa en un reactivo independiente de manera aislada, ya que los reactivos correspondientes, así como el protocolo del ensayo, se deben probar al mismo tiempo antes de utilizar un kit con fines de diagnóstico. Los tejidos que se enumeran en el Resumen de resultados previstos son aptos para llevar a cabo la verificación del ensayo.

Es necesario llevar a cabo todos los procedimientos de control de calidad de acuerdo con las normativas locales, estatales y federales o con los criterios de acreditación.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de tinción provoca que un producto de reacción con color se precipite en los sitios del antígeno que localiza el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de IHC debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados. El estado del receptor de progesterona se determina mediante el porcentaje de células tumorales con tinción. Para considerar que el resultado de un caso es positivo en PR, debe observarse una tinción en el núcleo de las células tumorales igual o superior al 1%.⁹

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) debería estudiarse primero para comprobar que los reactivos funcionan correctamente. La existencia de un producto de reacción marrón (3,3'-tetracloruro de diaminobencidina, DAB) en los núcleos de las células diana indica una reactividad positiva. Como ejemplo de tejidos que pueden servir como control positivo se encuentra el carcinoma de mama positivo débil conocido, es decir, $\geq 1\%$. Los núcleos de las células tumorales deberían ser positivos. Es obligatorio considerar positiva únicamente la tinción nuclear si se quiere evitar la interpretación errónea de falsos positivos. También es posible utilizar el endometrio humano normal. En el caso del endometrio normal, la tinción del PR se observa en los núcleos de las glándulas y el estroma endometriales. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Control tisular negativo

El control de tejido negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. El carcinoma de mama que se utiliza como control positivo también puede servir como tejido de control negativo. Ciertos elementos estromales, como las células endoteliales, cuya tinción negativa en PR se ha demostrado, no deberían presentar tinción nuclear. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjuntivo en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que en las células necróticas o degeneradas se suele observar una tinción no específica.¹⁸

Tejido del paciente

La tinción de muestras del paciente con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se debe estudiar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Es posible detectar PR entre otras neoplasias, como el cáncer de ovario y de endometrio.¹⁹ La morfología de cada muestra de tejido también se deberá estudiar a través de una sección con tinción de hematoxilina y eosina cuando se esté interpretando cualquier resultado de inmunohistoquímica. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado.

Para obtener más información sobre la inmunoreactividad, consulte las secciones Resumen y explicación, Limitaciones y Resumen de los resultados previstos.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica (IHC) es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser consecuencia de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Está previsto que este anticuerpo se use en un panel de anticuerpos. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para preparar la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
5. Ventana proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.
7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.²⁰ Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.²¹
9. Cuando se utilizan en los pasos de bloqueo, el suero normal de la misma fuente animal que el antisuero secundario pueden dar lugar a resultados de tinción falsos positivos o falsos negativos debido a la existencia de autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
10. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.¹⁸
11. Como ocurre en todas las pruebas de IHC, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

Limitaciones específicas

1. El anticuerpo, cuando se utiliza junto con los kit de detección y los accesorios VENTANA, detecta el antígeno que permanece una vez se han llevado a cabo la

fijación en formol, el procesamiento del tejido y el corte. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

- Un resultado negativo con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) no descarta la presencia del PR. Las reacciones negativas en los carcinomas de mama pueden ser consecuencia de la pérdida de la expresión del antígeno o de una marcada reducción de esta. Se recomienda, por tanto, que se utilice el anticuerpo como parte de un panel que incluya el receptor de estrógeno.
- Se ha observado la presencia de tinción nuclear positiva con el clon del anticuerpo 1E2 en tejido de amígdala.²² El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) no está indicado para su uso con la amígdala. Por tanto, si se recurre al tejido de amígdala como control tisular negativo, es necesario analizar los tejidos de amígdala para garantizar que se selecciona un caso de tinción negativo.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinaron mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos normales. Los resultados se resumen en la Tabla 4 y la Tabla 5. Se observó tinción nuclear positiva en todos los tejidos estudiados, con la única excepción del tejido de ovario, que presentó una tinción negativa imprevista. También se observó la presencia de tinción positiva en tejido tiroideo, algo que se había detectado ya anteriormente.²³ La tinción nuclear positiva con el clon del anticuerpo 1E2 ya se había visto en tejido de amígdala.²²

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/5	Esófago	0/3
Cerebelo	0/3	Estómago	0/3
Glándula suprarrenal	0/3	Intestino delgado	0/3
Ovario	2/3	Colon	0/3
Páncreas	3/3	Hígado	0/3
Glándula paratiroidea	0/4	Glándula salival	0/3
Glándula pituitaria	3/3	Riñón	0/3
Testículos	0/3	Próstata	1/3
Tiroides	0/5	Vejiga	0/5
Mama ^a	4/4	Endometrio	1/3
Bazo	1/3	Cuello del útero	8/8
Amígdala	1/3	Músculo esquelético	0/5
Timo	0/3	Piel	0/3
Médula ósea	0/3	Nervio	0/3
Pulmón	0/3	Mesotelio	0/3
Corazón	0/3		

^a Entre los tejidos había tejido fibroadiposo.

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos neoplásicos. Los casos se consideraron positivos en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	1/1
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	1/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	1/1
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	0/1
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	0/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	1/1
Carcinoma urotelial (uretra prostática)	1/1
Leiomioma (útero)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Adenocarcinoma (útero)	1/2
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	1/1
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células escamosas (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Neurofibroma (mediastino)	1/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Linfoma, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	0/1

La sensibilidad depende de la conservación del antígeno. El manejo incorrecto del tejido durante la fijación, el seccionado, la inclusión o el almacenamiento puede modificar la antigenicidad y debilitar la capacidad de detección del PR que tiene el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Precisión de los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad, se realizó la tinción de seis casos de tejidos independientes. De los seis tejidos, dos presentaban una elevada expresión del PR; en dos se observaba una expresión reducida del PR y los otros dos daban resultado negativo en PR en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 %; y expresión elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de 9 portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordó al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordó al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark XT, se realizó la tinción de 4 portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark XT independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark XT concordó al 100 % en los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA, se realizó la tinción de 4 portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark ULTRA independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA concordó al 100 % en los seis casos.

Todas las pruebas de reproducibilidad cumplieron los criterios de aceptación para que el resultado fuera apto.

Precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de nueve casos de tejidos independientes. De los nueve tejidos, tres presentaban una elevada expresión del PR; en tres se observaba una expresión reducida del PR y los otros tres daban resultado negativo en PR en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 %; y expresión elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de cinco portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La concordancia de la repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS fue del 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS concordó al 97.8 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA PLUS, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS fue del 98.1 %.

Reproducibilidad entre laboratorios

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con una sesión de 14 portaobjetos de cáncer de mama (8 positivos, 2 con positividad reducida y 4 negativos) en 3 instrumentos BenchMark XT y 3 instrumentos BenchMark ULTRA, con detección mediante MIEW DAB y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit en cada uno de los 5 días no consecutivos durante un periodo mínimo de 20 días en 3 laboratorios externos. Las muestras se asignaron de forma aleatoria y fueron evaluadas por 6 anatomopatólogos (2 por cada centro) para obtener el porcentaje de células tumorales con tinción. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, el 1 % de las células tumorales invasivas.⁹

En cuanto a la precisión entre centros, los porcentajes del promedio de concordancia positiva (APA) y del promedio de concordancia negativa (ANA) en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.6 % y 95.4 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.4 % y del 98.4 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del 97.4 % y 91.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre días, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.5 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.3 % y 98.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del 97.0 % y 90.8 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre lectores, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.6 % y 95.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.3 % y 98.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del

98.6 % y 95.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre plataformas en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, los porcentajes de APA y ANA fueron del 99.5 % y 98.7 %, respectivamente, con detección mediante *VIEW*; y del 98.0 % y 93.9 %, respectivamente, con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Con respecto a la precisión dentro de la misma plataforma, los porcentajes de APA y ANA fueron del 98.7 % y 96.4 %, respectivamente, con el instrumento BenchMark ULTRA; y del 97.4 % y 92.6 %, respectivamente, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Comparativa entre el *VIEW* DAB Detection Kit y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se utilizó para llevar a cabo una prueba comparativa de detección entre dos instrumentos (BenchMark XT y BenchMark ULTRA) con el *VIEW* DAB Detection Kit y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit. La prueba se realizó con ciento noventa y nueve casos de tejido. Del total, aproximadamente la mitad eran positivos y la otra mitad negativos en función del porcentaje de células tumorales que presentaba tinción. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales.

El índice de aceptabilidad de la morfología y del fondo fue del 100 % tanto en los kits de detección como en los instrumentos, salvo en el caso del *ultraView* Universal DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA, cuyo índice de aceptabilidad del fondo fue del 99.5 %. Las comparaciones directas de las evaluaciones clínicas positivas y negativas entre los kits de detección en cada una de las plataformas se muestran en la Tabla 6, en el caso del instrumento BenchMark ULTRA, y en la Tabla 7, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Tabla 6. Evaluación clínica de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit con el instrumento BenchMark ULTRA.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	94	11	105
Negativa	2	86	88
Total	96	97	193
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	94/96	97.9 (92.7-99.4)	
Porcentaje de concordancia negativa	86/97	88.7 (80.8-93.5)	
Porcentaje de concordancia global	180/193	93.3 (88.8-96.0)	

Tabla 7. Evaluación clínica de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit con el instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	91	14	105
Negativa	2	86	88
Total	93	100	193
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	91/93	97.8 (92.5-99.4)	

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Porcentaje de concordancia negativa	86/100	86.0 (77.9-91.5)	
Porcentaje de concordancia global	177/193	91.7 (87.0-94.8)	

La concordancia de la evaluación clínica entre los kits de detección en ambos instrumentos estuvo por encima del 90 %: un 93.3 % (n = 193) y un 91.7 % (n = 193) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, respectivamente. El *ultraView* Universal DAB Detection Kit, en comparación con el *VIEW* DAB Detection Kit, obtuvo un índice de concordancia en la puntuación de la tinción del 90.2 % (n = 193) y del 85.5 % (n = 193).

Comparación del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS frente al instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron ciento treinta y cuatro (134) casos de tejido de carcinoma de mama (61 positivos en PR, 61 casos negativos en PR y 12 casos en el límite de positividad en PR) que reflejaban el rango clínico del ensayo. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, una cifra ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.⁹ La comparación directa del estado positivo y negativo en PR entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark ULTRA PLUS se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA (sin incluir los casos en el límite de positividad).

Instrumento BenchMark ULTRA PLUS	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	79	2	81
Negativa	6	23	29
Total	85	25	110
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	79/85	92.9 (85.4-96.7)	
Porcentaje de concordancia negativa	23/25	92.0 (75.0-97.8)	
Porcentaje de concordancia global	102/110	92.7 (86.3-96.3)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 97.2%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 97.2%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y FLEX anti-PR (PgR 636).

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado en múltiples centros y con lector múltiple para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT con el de Dako FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor Clone PgR 636 Ready-To-Use (FLEX anti-PR (PgR 636)) en un instrumento Dako Autostainer Plus. La biotina endógena, en el caso de los instrumentos BenchMark IHC/ISH, se bloqueó con VENTANA Endogenous Biotin Blocking Kit. El anticuerpo se detectó con el *VIEW* DAB Detection Kit. En la plataforma

Dako, la detección del anticuerpo se realizó mediante EnVision Flex, High pH. El rango clínico del ensayo estaba representado por aproximadamente 120 casos de cáncer de mama negativos y 216 casos positivos, que se asignaron aleatoriamente a los tres sitios que llevarían a cabo el estudio, de forma que cada uno de ellos recibiese la misma cantidad de casos y que los casos representasen cada una de las categorías de evaluación clínica. Cada sitio se ocupó de la tinción de los casos asignados con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA, en un instrumento BenchMark XT con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y en un instrumento Dako Autostainer Plus con FLEX anti-PR (PgR 636). Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, una cifra ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.⁹

Tabla 9. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA y FLEX anti-PR (PgR 636) en Dako Autostainer Plus.

Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)	FLEX anti-PR (PgR 636)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	200	7	207
Negativa:	9	104	113
Total:	209	111	320
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	200/209	95.7 (92.0-97.7)	
Porcentaje de concordancia negativa	104/111	93.7 (87.6-96.9)	
Porcentaje de concordancia global	304/320	95.0 (92.0-96.9)	

Tabla 10. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark XT y FLEX anti-PR (PgR 636) en el Dako Autostainer Plus.

Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)	FLEX anti-PR (PgR 636)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	186	9	195
Negativa:	18	100	118
Total:	204	109	313
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	186/204	91.2 (86.5-94.3)	
Porcentaje de concordancia negativa	100/109	91.7 (85.0-95.6)	
Porcentaje de concordancia global	286/313	91.4 (87.7-94.0)	

En el caso de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, en comparación con FLEX anti-PR (PgR 636) en un Dako Autostainer Plus, los índices de concordancia global, positiva y negativa (obtenidos en todos los centros) fueron superiores al 90 %.

Tabla 11. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA y el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark XT.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	184	12	196
Negativa:	6	105	111
Total:	190	117	307
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	184/190	96.8 (93.3-98.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	105/117	89.7 (82.9-94.0)	
Porcentaje de concordancia global	289/307	94.4 (90.9-96.3)	

En el caso de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA, en comparación con el instrumento BenchMark XT, los índices de concordancia global, positiva y negativa fueron superiores al 89 %.

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 99.7 % (C.I. del 95 %: 98.3 %-99.9 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 96.1 % (C.I. del 95 %: 93.5 %-97.7 %) en el del instrumento BenchMark XT. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 99.4 % (C.I. del 95 %: 97.9 %-99.8 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 95.2 % (C.I. del 95 %: 92.4 %-97.0 %) en el del instrumento BenchMark XT.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el portaobjetos se ha etiquetado correctamente, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
- Si la tinción de fondo es excesiva, es posible que se observen niveles elevados de biotina endógena. Debería incorporarse un paso de bloqueo de la biotina.
- Si no se ha eliminado toda la parafina, repita el proceso de desparafinado.
- Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, repita la sesión reduciendo el tiempo de incubación del anticuerpo primario en intervalos de 4 minutos para obtener la intensidad de tinción deseada.
- Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
- Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento paso a paso del Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

- Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ. Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2008;18(1):11-33.
- Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol*. 2016;428(19):3831-3849.
- Tanos T, Rojo L, Echeverria P, et al. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):210.
- Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):444-457.

Farm. ROBERTA HILLIOTT
 PRODUZIONE ROCHÉ S.p.A. e l.
 Divisione Diagnostica
 DT & APOCARIATOLOGIA

5. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2019.
6. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24(9):2206-2223.
7. Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. Rev Endocr Metab Disord. 2007;8(3):229-239.
8. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. Science. 1975;189(4204):726-727.
9. Hammond ME, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2010;134(6):907-22.
10. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. J Clin Oncol. 2003;21(10):1973-1979.
11. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol. 1992;10(8):1284-1291.
12. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
13. Occupational Safety and Health Standard: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
14. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
15. Roche PC, His ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
16. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
17. 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.
18. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
19. Press MF, Greene GL. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. Endocrinology. 1988;122(3):1165-1175.
20. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
21. 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.
22. Guadagno E, De Rosa G, Nappi O. A National Quality Assurance Program for Breast Immunohistochemistry: An Italian Perspective. Pathologica. 2018;110(2):83-91.
23. Money SR, Muss W, Thelmo WL, et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in human thyroid. Surgery. 1989;106(6):975-8.

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

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

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

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificador único del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el dispositivo médico a la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
F	Se han actualizado las secciones Preparación de muestras, Procedimiento de tinción, Rendimiento de análisis, Propiedad Intelectual e Información de contacto. Se ha añadido el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

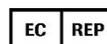
© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA M.F.L. MAZZA
PRODOTTORE ROCHE S.p.A. e i.
Divisione Diagnostica
DT & APODERATA LEGAL

CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4324  50

05278406001

REF 790-4325  250

05278414001

IVD

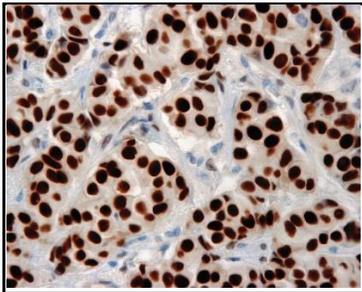


Figura 1. Tinción del carcinoma lobulillar de mama con el anticuerpo CONFIRM anti ER (SP1)

USO PREVISTO

CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1)) está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente

en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Uso exclusivo con receta médica.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) es un anticuerpo monoclonal de conejo que detecta la presencia del receptor de estrógeno alfa humano (ER). El ER es un receptor de hormonas nuclear codificado por dos genes diferentes, ESR1 y ESR2, que transcriben las isoformas alfa y beta respectivamente.^{1,2} ER alfa es la expresión de la isoforma primaria en células epiteliales lumbales de tejido mamario.^{1,2} La actividad del ER estimula el desarrollo normal de la glándula mamaria y es necesaria para la diferenciación y la proliferación en el epitelio mamario adulto.^{3,4} En las células neoplásicas, la hiperactividad del ER, provocada por una sobreexpresión del receptor, da lugar a una serie de eventos celulares cuyo resultado es la hiperproliferación y la formación de tumores.⁵

El cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres.⁶ El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad depende de su detección precoz junto con una estrategia de tratamiento adecuada basada en factores pronósticos y predictivos.^{7,8} En 1973 se identificó la capacidad del ER para indicar el pronóstico en el cáncer de mama y su valor a la hora de predecir la respuesta al tratamiento endocrino se evaluó mediante una cohorte muy amplia en 1986.^{9,10} Desde entonces, el ER se ha convertido en un modelo de marcador tumoral que sirve para el control de pacientes con cáncer de mama. La presencia de una elevada concentración del ER en el tumor mamario está relacionada con una respuesta más eficaz a la terapia endocrina.^{7,8} El conocimiento del estado del ER desempeña un papel importante en la elección del tratamiento para la paciente, pero no puede ser el único factor que se tenga en cuenta.^{7,8} Varios estudios han demostrado que la presencia del ER está asociada a un pronóstico favorable a largo plazo.^{10,11}

Las directrices clínicas y las pautas de las prácticas recomendadas indican que el estado del ER se debe evaluar en todos los casos de cáncer de mama primario invasivo para

identificar a las pacientes que tienen más probabilidades de responder a los tratamientos de tipo endocrino.^{7,8} Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno bloquean el crecimiento del cáncer inducido por el estrógeno moderando la hiperactividad del ER y se utilizan en terapias endocrinas (hormonales) en pacientes que presentan una sobreexpresión del receptor.^{8,12} En la actualidad, la primera opción de tratamiento para los carcinomas positivos en el ER es el tamoxifeno.^{7,8}

Las directrices y las pautas de las prácticas recomendadas hacen hincapié en que el método preferible para detectar el ER en el cáncer de mama es la inmunohistoquímica (IHC).¹³ Los estudios de amplias cohortes de casos de cáncer de mama invasivos concluyen que el clon anti-ER SP1 ofrece mayor sensibilidad para la detección del ER que los clones monoclonales de ratón 1D5 y 6F11.^{14,15} La detección mediante IHC del ER con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) puede servir como ayuda en el control, el pronóstico y la predicción de la terapia hormonal en el tratamiento del carcinoma de mama.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se une al ER en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecte inmunoglobulinas de conejo, seguida de la incorporación de un conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) estreptavidina (MIEW DAB Detection Kit) o mediante un conjugado de anticuerpo secundario y peroxidasa de rábano (HRP) (ultraView Universal DAB Detection Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática. Los casos clínicos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Ventana recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o de útero positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1), se debe teñir un segundo portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción nuclear de las células tumorales o de las glándulas uterinas y el estroma. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portaobjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama negativo en el ER) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º cat. 790-4324) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) contiene aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno ER humano.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º cat. 790-4325) contiene reactivo suficiente para 250 pruebas.

Un dispensador de 25 mL de anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) contiene aproximadamente 25 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno ER humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón formado por Tris-HCl con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.10 %, un conservante. Existen trazas (~ 0.2 %) de suero bovino fetal con origen en Estados Unidos de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 1 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) es un anticuerpo monoclonal de conejo producido como sobrenadante de cultivo celular.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
5. *VIEW* DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001)
6. A/B Block (Endogenous Biotin Blocking Kit) (n.º cat. 760-050 / 05266092001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH
16. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. Para procesar las muestras, se recomienda seguir los pasos que aparecen a continuación:¹⁶

1. Coloque la muestra en formol tamponado neutro al 10 %. La cantidad usada es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15-25 °C).
2. Después de la fijación, la muestra debe colocarse en un instrumento de procesamiento de tejidos para prepararla durante la noche. En resumen, el proceso consiste en deshidratar la muestra con alcoholes y, a continuación, eliminar estos mediante reactivos de aclarado para finalmente llevar a cabo la infiltración con parafina.
3. Las muestras se embeben con parafina en casetes de tejido y se cortan secciones de aproximadamente 4 µm de grosor que se centran y se recogen en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. El tejido deberá dejarse secar al aire colocando los portaobjetos a temperatura ambiente durante la noche o en un horno a 60 °C durante 30 minutos.

Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel.

6. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
7. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
8. Este producto contiene un 1 % de suero bovino o una cantidad menor, que se utiliza en la producción del anticuerpo.
9. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables. 17,18
10. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
11. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
12. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en dialog.roche.com.
13. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
14. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
15. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información sobre riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P261	Evite inhalar la niebla o los vapores.
	P273	Evitar su emisión al medio ambiente.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.	

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, una masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte Tabla 2 y Tabla 3 para ver los protocolos de tinción recomendados.

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 790-4324 o P/N 790-4325.

Farm. ROBERTA M.F.L.C. MOZZA
PRODOTTI ROCHE S.A. s.r.l.
Divisione Diagnostica
DT & APODERATA LEGAL

La verificación y validación de los procedimientos de tinción recomendados en cada kit de detección se demuestran mediante pruebas de control de diseño y resultados de estudios clínicos.

Cualquier modificación que se realice en los procedimientos de tinción recomendados anulará las características de rendimiento que se suministran en esta hoja de datos. El usuario deberá hacerse responsable de las modificaciones que realice en el procedimiento de tinción recomendado.

Tabla 2. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con *ultraView Universal DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

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

Tabla 3. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con *VIEW DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Estándar
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Bloque A/B (Bloqueador de biotina)	Necesario	Necesario
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».¹⁹

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe incluir un control de tejido positivo en cada sesión de tinción. El College of American Pathologists recomienda que el control de tejido positivo se encuentre en el portaobjetos de la paciente.¹³ Como ejemplo de control de tejido positivo para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se encuentra el carcinoma de mama positivo débil. Las células o componentes de tejido con tinción positiva (tinción nuclear de células tumorales) se utilizan para confirmar que el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se ha aplicado y que el instrumento ha funcionado correctamente. El tejido de control puede contener células o elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra extraída recientemente de autopsia, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se

utilizarán para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actuará como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos.

Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. La opción más idónea es elegir un tejido de carcinoma de mama, que se caracteriza por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC.

Si no es posible, se puede utilizar endometrio proliferativo normal humano como control positivo. Los componentes de tinción positiva son la tinción nuclear de epitelios glandulares y células estromales y de músculo liso. Es posible, no obstante, que la tinción del tejido endometrial no sea lo suficientemente débil para detectar niveles bajos de degradación de los reactivos o problemas con la metodología IHC.

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad.

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

CONTROL TISULAR NEGATIVO

Con un control tisular que se haya fijado, procesado y embebido de la misma forma que las muestras de la paciente se puede verificar en cada sesión de tinción la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) para detectar ER, así como proporcionar una indicación sobre una tinción de fondo específica (falsos positivos en la tinción). Además, incluir una variedad de tipos de células diferentes en la mayor parte de las secciones de tejido puede servir como control negativo para comprobar las especificaciones de rendimiento del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Por ejemplo, el mismo tejido (endometrio) que se utiliza como control de tejido positivo puede servir como control de tejido negativo. Los componentes que no van a tener tinción, como el citoplasma y la membrana celular, deberían mostrar la ausencia de una tinción específica en aquellas células que no está previsto que se tiñan, facilitando una indicación sobre la tinción de fondo específica. El control de tejido negativo también puede servir de ayuda en la interpretación de los resultados. La variedad de los diferentes tipos de células presentes en la mayor parte de las secciones de tejido suele ofrecer puntos de control negativo, pero es necesaria su comprobación por parte del usuario. Si se presenta una tinción específica en los puntos de control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

CONTROL DE REACTIVO NEGATIVO

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. El control de reactivo negativo se utiliza en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica y permitir que se interprete de forma más precisa la tinción específica en el sitio del antígeno. Todo ello indica la tinción de fondo no específica en cada portaobjetos. En lugar del anticuerpo primario, tiña el portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig, un IgG purificado de conejo no inmune que no reacciona con muestras humanas. Si se utiliza un control de reactivo negativo diferente, dilúyalo con Antibody Diluent en la misma proporción de dilución que el antisuero del anticuerpo primario. En el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) existe una retención de aproximadamente el 0.2 % de suero bovino fetal. También se considera adecuada la incorporación de un 0.2 % de suero bovino fetal a Antibody Diluent para usarlo como control de reactivo negativo no específico. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, la presencia de un control de reactivo negativo en un portaobjetos puede servir como control de fondo de unión no específica o negativa de otros anticuerpos.

VERIFICACIÓN DEL ENSAYO

Antes de usar por primera vez el anticuerpo en un procedimiento diagnóstico, o ante un cambio de lote, es necesario comprobar la especificidad del anticuerpo llevando a cabo una tinción de varios tejidos negativos y positivos cuyas características de rendimiento se conocen de antemano. Consulte los procedimientos de control de calidad que se han

mencionado previamente en esta sección del prospecto y las recomendaciones de control de calidad de College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist o CLSI Approved Guideline o todos ellos.^{20,21} Estos procedimientos de control de calidad deberían repetirse cada vez que se utilice un lote de anticuerpo nuevo, cuando se cambie el número de lote de uno de los reactivos del conjunto correspondiente o se modifiquen los parámetros del ensayo. El control de calidad no se puede llevar a cabo de forma significativa en un reactivo independiente de manera aislada, ya que los reactivos correspondientes, así como el protocolo del ensayo, se deben probar al mismo tiempo antes de utilizar un kit con fines de diagnóstico. Los tejidos que se enumeran en el Resumen de resultados previstos son aptos para llevar a cabo la verificación del ensayo.

Es necesario llevar a cabo todos los procedimientos de control de calidad de acuerdo con las normativas locales, estatales y federales o con los criterios de acreditación.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de inmunotinción automatizada VENTANA provoca que un producto de reacción con color se precipite en los puntos del antígeno que localiza el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados. El estado del receptor de estrógeno se determina mediante el porcentaje de células tumorales con tinción. Para considerar que el resultado de un caso es positivo en ER, debe observarse una tinción en el núcleo de las células tumorales igual o superior al 1%.¹³ Es posible que haya presencia de tinción específica en el estroma y los linfocitos. Al evaluar estos portaobjetos es indispensable tener en cuenta únicamente la tinción nuclear que presentan las células tumorales.

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) debería estudiarse primero para comprobar que los reactivos funcionan correctamente. La existencia de un producto de reacción marrón (3,3' tetracloruro de diaminobencidina, DAB) en los núcleos de las células diana indica una reactividad positiva. Como ejemplo de tejidos que pueden servir como control positivo se encuentra el carcinoma de mama positivo débil conocido, es decir, el tejido en el que $\geq 1\%$ de los núcleos de las células tumorales presenten una tinción positiva. También es posible utilizar el endometrio humano normal. En el caso del endometrio normal, la tinción del ER se observa en los núcleos de las glándulas y el estroma endometriales. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Control tisular negativo

El control tisular negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. El carcinoma de mama que se utiliza como control positivo también puede servir como tejido de control negativo. Ciertos elementos estromales, como las células endoteliales, cuya tinción negativa en el ER se ha demostrado, no deberían presentar tinción nuclear. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjuntivo en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que en las células necróticas o degeneradas se suele observar una tinción no específica.²²

Tejido del paciente

La tinción de muestras del paciente con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se debe estudiar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Es posible detectar ER entre otras neoplasias, como en el cáncer de ovario y de endometrio.¹³ La morfología de cada muestra de tejido también se deberá estudiar a través de una sección con tinción de hematoxilina y eosina cuando se esté interpretando cualquier resultado de inmunohistoquímica. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado. Para obtener más información sobre la inmunoreactividad, consulte las secciones Resumen y explicación, Limitaciones y Resumen de los resultados previstos.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica (IHC) es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser consecuencia de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Está previsto que este anticuerpo se use en un panel de anticuerpos. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para preparar la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
5. Ventana proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.
7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.²² Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.²³
9. Cuando se utilizan en los pasos de bloqueo, el suero normal de la misma fuente animal que el antisuero secundario pueden dar lugar a resultados de tinción falsos positivos o falsos negativos debido a la existencia de autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
10. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.²⁴
11. Como ocurre en todas las pruebas de IHC, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

1. El anticuerpo, cuando se utiliza junto con los kit de detección y los accesorios VENTANA, detecta el antígeno que permanece una vez se han llevado a cabo la fijación en formol, el procesamiento del tejido y el corte. Los usuarios que no sigan

- los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.
- Un resultado negativo con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) no descarta la presencia de ER. Las reacciones negativas en los carcinomas de mama pueden ser consecuencia de la pérdida de la expresión del antígeno o de una marcada reducción de esta. Se recomienda, por tanto, que se utilice el anticuerpo como parte de un panel que incluya el receptor de progesterona.
 - Es posible que no estén todos los ensayos registrados en cada instrumento. Póngase en contacto con el representante local de servicio Roche para obtener más información.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos normales. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/5	Esófago	0/3
Cerebelo	0/3	Estómago	0/3
Glándula suprarrenal	0/3	Intestino delgado	0/3
Ovario	1/3	Colon	0/3
Páncreas	0/3	Hígado	0/3
Glándula paratiroidea	0/4	Glándula salival	0/3
Glándula pituitaria	3/3	Riñón	0/3
Testículos	0/3	Próstata	2/3
Tiroides	1/5	Vejiga	0/5
Mama ^a	12/12	Endometrio	3/3
Bazo	0/3	Cuello del útero	1/3
Amígdala	1/3	Músculo esquelético	0/3
Timo	0/3	Piel ^b	0/5
Médula ósea	0/3	Nervio	0/3
Pulmón	0/3	Mesotelio	0/3
Corazón	0/3		

^a Entre los tejidos había tejido fibroadiposo.

^b En los tejidos se encontraba tejido de pezón.

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos neoplásicos. Los casos se consideraban positivos en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³ Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	0/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/3
Carcinoma ductal invasivo (mama)	9/20
Carcinoma lobulillar invasivo (mama)	2/3
Carcinoma medular (mama)	0/1
Carcinoma papilar (mama)	1/1
Carcinoma de mama (metastásico)	0/5
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	0/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (intestino)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma urotelial (uretra prostática)	1/1
Leiomioma (útero)	1/1
Adenocarcinoma (útero)	2/2
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/1
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (músculo estriado)	0/1
Neurofibroma (mediastino)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma de células fusiformes (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Linfoma, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomiomasarcoma (músculo liso)	0/1

La sensibilidad depende de la conservación del antígeno. El manejo incorrecto del tejido durante el fijado, el corte, la inclusión o el almacenamiento puede modificar la antigenicidad y debilitar la capacidad de detección de ER que tiene el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Precisión de los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de seis casos de tejidos independientes. De los seis tejidos, dos presentaban una elevada expresión de ER; en dos se observaba una expresión reducida de ER y los otros dos daban resultado negativo en ER en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 % y elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de nueve portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark XT, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark XT independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark XT concordaba al 100 % en los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark ULTRA independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de nueve casos de tejidos independientes. De los nueve tejidos, tres presentaban una elevada expresión de ER; en tres se observaba una expresión reducida de ER y los otros tres daban resultado negativo en ER en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1-10 %; y elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de cinco portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La concordancia de la repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS fue del 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS concordaba al 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA PLUS, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS era del 100 %.

Reproducibilidad entre laboratorios

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con una sesión de 14 portaobjetos de cáncer de mama (8 positivos, 2 con positividad reducida y 4 negativos) en 3 instrumentos BenchMark XT y 3 instrumentos BenchMark ULTRA, con detección *VIEW DAB* y detección *ultraView DAB* en cada uno de los 5 días no consecutivos durante un periodo mínimo de 20 días en 3 laboratorios externos. Las muestras se asignaron de forma aleatorizada y fueron evaluadas por 6 anatomopatólogos (2 por cada centro) para obtener el porcentaje de células tumorales con tinción. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales invasivas.¹³

En cuanto a la precisión entre sitios, los porcentajes del promedio de concordancia positiva (APA) y del promedio de concordancia negativa (ANA) en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 94.3 % y 87.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*; del 94.2 % y 85.8 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 95.6 % y del 90.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 94.2 % y 85.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre días, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 97.9 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*;

del 98.4 % y 96.2 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 98.0 % y 95.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 98.2 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre lectores, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 95.7 % y 90.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*; del 94.1 % y 85.7 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 94.9 % y 89.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 93.4 % y 83.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre plataformas en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, los porcentajes de APA y ANA fueron del 97.8 % y 95.5 %, respectivamente, con detección de *VIEW* y del 98.9 % y 97.4 %, respectivamente, con detección de *ultraView*.

Con respecto a la precisión dentro de la misma plataforma, los porcentajes de APA y ANA fueron del 97.9% y 95.2%, respectivamente, con el instrumento BenchMark ULTRA; y del 97.8% y 95.0%, respectivamente, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Comparativa entre *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1)

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se utilizó para llevar a cabo una prueba comparativa de detección entre dos instrumentos (BenchMark XT y BenchMark ULTRA) con *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. La prueba se realizó con ciento noventa y nueve (199) casos de tejido. De los casos que se analizaron se pudo determinar, mediante el instrumento BenchMark ULTRA, que 111 eran positivos y 83 negativos en función del porcentaje de células tumorales que presentaba tinción. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales.

Los índices de aceptabilidad de la morfología y del fondo fueron del 100 % tanto en los kit de detección como en los instrumentos. Las comparaciones directas de las evaluaciones clínicas positivas y negativas entre los kit de detección en cada uno de los instrumentos se muestran en la Tabla 6, en el caso del instrumento BenchMark ULTRA, y en la Tabla 7, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Tabla 6. Evaluación de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	108	3	111
Negativa	3	80	83
Total	111	83	194
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	108/111	97.3 (92.4-99.1)	
Porcentaje de concordancia negativa	80/83	96.4 (89.9-98.8)	
Porcentaje de concordancia global	188/194	96.6 (93.4-98.6)	

Tabla 7. Evaluación de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	106	5	111
Negativa	2	79	81
Total	108	84	192

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	106/108	98.1 (93.5-99.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	79/84	94.0 (86.8-97.4)	
Porcentaje de concordancia global	185/192	96.4 (92.7-98.2)	

La concordancia global de la evaluación entre los kit de detección en ambas plataformas fue del 96.9 % (n = 194) y del 96.4 % (n = 192) en el caso de los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, respectivamente. *ultraView* Universal DAB Detection Kit, en comparación con el *VIEW* DAB Detection Kit, obtuvo un índice de concordancia en la puntuación de la tinción del 93.3 % (n = 194) y del 93.8 % (n = 192).

Comparación del instrumento BenchMark XT frente al instrumento BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado en diferentes centros y con varios lectores para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT. El rango clínico del ensayo estaba representado por ciento veinte (120) casos de cáncer de mama negativos en ER y 132 casos positivos en ER, que se asignaron aleatoriamente a los tres centros que llevarían a cabo el estudio, de forma que cada uno de ellos recibiese la misma cantidad de casos y que los casos representasen cada una de las categorías de evaluación clínica. Cada centro se ocupó de realizar la tinción de los casos asignados con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA y en un instrumento BenchMark XT con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.¹³

Tabla 8. Anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA y anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark XT.

Instrumento BenchMark XT	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	99	8	107
Negativa	11	91	102
Total	110	99	209
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	99/107	92.5 (85.9-96.2)	
Porcentaje de concordancia negativa	91/102	89.2 (81.7-93.9)	
Porcentaje de concordancia global	190/209	90.9 (86.2-94.1)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 100 % (C.I. del 95 %: 98.5 %-100 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 94.0 % (C.I. del 95 %: 90.4 %-96.4 %) en el del instrumento BenchMark XT. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 94.8% (C.I. del 95 %: 91.4 %-97.0 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 90.9 % (C.I. del 95 %: 86.7 %-93.8 %) en el del instrumento BenchMark XT.

Comparación del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS frente al instrumento BenchMark ULTRA. Se tuvieron ciento veinte (120) casos de tejido de carcinoma de mama (54 positivos en ER, 54 casos negativos enER y 12 casos en el

límite de positividad en ER) que reflejaban el rango clínico del ensayo. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Los casos se consideraban positivos en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³ Los índices de concordancia entre los casos teñidos con cada instrumento se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA (sin incluir los casos en el límite de la positividad).

Instrumento BenchMark ULTRA PLUS	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	53	0	53
Negativa	0	53	53
Total	53	53	106
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	53/53	100.0 (93.2-100.0)	
Porcentaje de concordancia negativa	53/53	100.0 (93.2-100.0)	
Porcentaje de concordancia global	106/106	100.0 (96.5-100.0)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 99.2% (C.I. del 95 % 95.4%-99.9%) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 96.8%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Comparativa entre los resultados de pacientes

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, en un solo centro y con lector múltiple, con muestras de 511 casos de cáncer de mama invasivo recogidos en una cohorte clínica de 820 pacientes de cáncer de mama invasivo. Los resultados de la supervivencia libre de progresión se compararon en el caso de las pacientes en las que se había determinado un estado diferente del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) mediante el instrumento BenchMark ULTRA. Se incorporaron en los análisis los casos en los que la paciente contaba con un diagnóstico de carcinoma de mama invasivo confirmado y recibía tratamiento con una intervención quirúrgica primaria, con o sin tratamiento de radioterapia local postoperatorio, seguido por una terapia endocrina adyuvante con tamoxifeno (20 mg por vía oral al día) durante 5 años. Se excluyeron de los análisis los casos en los que no se encontraban disponibles las muestras de tejido de biopsias diagnósticas o de intervenciones quirúrgicas primarias, los casos en los que hubiera un diagnóstico de cáncer previo (salvo de cáncer de piel sin melanoma) o aquellos en los que la paciente hubiera recibido tratamiento de quimioterapia adyuvante o previo. Se realizó la tinción de un total de 1907 núcleos de micromatrices de tejido con tumor primario en el instrumento BenchMark ULTRA. Tres anatomopatólogos independientes evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³

En el estudio se encontraron 441 pacientes con estado positivo en Ventana ER (ER+) y 18 pacientes con estado negativo en Ventana ER (ER-). Un gráfico Kaplan-Meier de supervivencia determinado por el estado del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) entre la población del análisis primario de supervivencia mostraba una gran diferencia entre los casos Ventana ER+ y ER-. Las pacientes con ER+ experimentaron periodos de supervivencia más prolongados que las pacientes con ER- al administrar un tratamiento de tamoxifeno; la mediana del periodo de supervivencia para las pacientes con ER+ y ER- era de 101.6 y 47.2 meses respectivamente. La prueba de rango logarítmico mostraba que la diferencia en los gráficos de supervivencia era estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

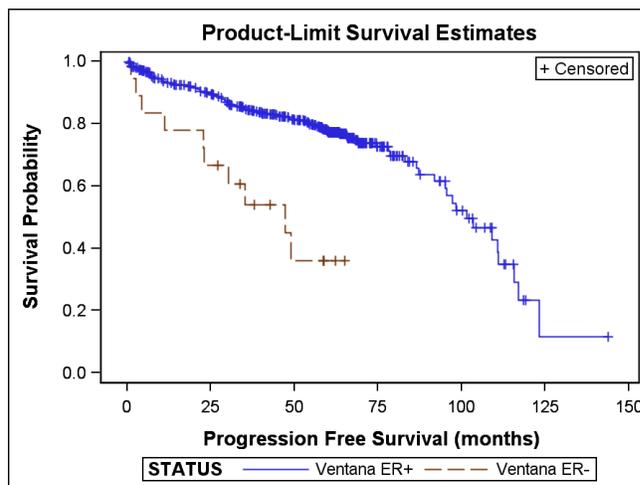


Figura 2. Gráfico Kaplan-Meier de supervivencia por estado Ventana ER.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el portaobjetos se ha etiquetado correctamente, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
3. Si la tinción de fondo es excesiva, es posible que se observen niveles elevados de biotina endógena. Debería incorporarse un paso de bloqueo de la biotina.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina, repita el proceso de desparafinado.
5. Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, repita la sesión reduciendo el tiempo de incubación del anticuerpo primario en intervalos de 4 minutos para obtener la intensidad de tinción deseada.
6. Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
7. Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento paso a paso del Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

1. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. 2014;90:13-29.
2. Yasar P, Ayaz G, User SD, et al. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2017;16(1):4-20.
3. Tanos T, Rojo L, Echeverria P, et al. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):210.
4. Diep CH, Ahrendt H, Lange CA. Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. *Steroids*. 2016;114:48-58.
5. Carroll JS. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(1):R41-49.
6. Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):444-457.
7. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019.
8. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus

- on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-2223.
9. McGuire WL. Estrogen receptors in human breast cancer. *J Clin Invest.* 1973;52(1):73-77.
 10. Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, et al. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. *Clinical correlation on 547 patients.* *Cancer.* 1986;57(6):1171-1180.
 11. Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, et al. Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. *JCO.* 2006;24(36):5637-5644.
 12. Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(3):229-239.
 13. Hammond ME, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):907-22.
 14. Bae YK, Gong G, Kang J, et al. Hormone Receptor Expression in Invasive Breast Cancer Among Korean Women and Comparison of 3 Antiestrogen Receptor Antibodies - A Multi-institutional Retrospective Study Using Tissue Microarrays. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1817-1825.
 15. Bogina G, Zamboni G, Sapino A, et al. Comparison of Anti-Estrogen Receptor Antibodies Sp1, 6f11, and 1d5 in Breast Cancer: Lower 1d5 Sensitivity but Questionable Clinical Implications. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(5):697-702.
 16. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition.* Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
 17. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register.*
 18. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
 19. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition.* In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
 20. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist, 2010.*
 21. 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.
 22. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
 23. 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.
 24. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.

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

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

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

Símbolos

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

 Número mundial de artículo comercial

 Identificador único del dispositivo

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

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
G	Se han actualizado las secciones Advertencias y precauciones y Rendimiento de análisis.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA MILLE MOZZA
PRODUCES ROCHE S.p.A. e l.
Division Diagnostica
DT & APODIAROT LEGAL

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-2223  50

05277990001

REF 790-4296  250

05278392001

IVD

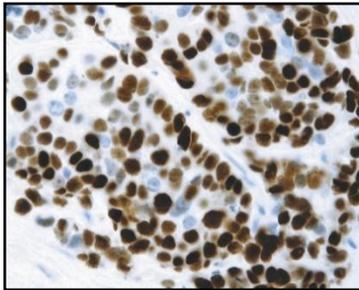


Figura 1. Tinción del carcinoma ductal de mama con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)

USO PREVISTO

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal (IgG) Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de

progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Uso exclusivo con receta médica.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)) es un anticuerpo monoclonal de conejo que detecta las isoformas A y B del receptor de progesterona humana (PR). El inmunógeno se ha desarrollado a partir de un péptido sintético identificado como una zona de elevada antigenicidad potencial común a las formas A y B del receptor de progesterona. El péptido se ha sintetizado y se ha unido de forma covalente con la hemocianina de lapa de ojo de cerradura para aumentar su antigenicidad. Se ha demostrado que el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) reacciona con las proteínas 60 kD, 87 kD y 110 kD de las células T47D mediante la técnica Western blotting. El tamaño de las proteínas concuerda con el peso molecular previsto de las formas A, B y C del receptor de progesterona.¹

El PR es un receptor de hormonas nuclear codificado por un solo gen (PGR).^{1,2} La actividad del PR se regula mediante el receptor de hormonas nuclear estrechamente asociado a él: el receptor de estrógeno (ER). Las acciones coordinadas del ER y PR estimulan el desarrollo normal de la glándula mamaria y son necesarias para la diferenciación y la proliferación en el epitelio adulto de mama.^{1,2,3}

El cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres.⁴ El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad depende de su detección precoz junto con una estrategia de tratamiento adecuada basada en factores pronósticos y predictivos.^{5,6} La evaluación diagnóstica que se adopta en los casos de cáncer de mama comprende una combinación del reconocimiento físico, las técnicas de imagen y la valoración anatomopatológica.⁵

El ER es un modelo de marcador tumoral que sirve para el control de pacientes con cáncer de mama. Las directrices clínicas y las pautas de las prácticas recomendadas indican que el estado del ER se debe evaluar en todos los casos de cáncer de mama primario invasivo para identificar a las pacientes que tienen más probabilidades de

responder a los tratamientos de tipo endocrino.^{5,6} Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno bloquean el crecimiento del cáncer inducido por el estrógeno moderando la hiperactividad del ER y se utilizan en terapias endocrinas en pacientes que presentan una sobreexpresión del receptor.^{6,7}

En la práctica, casi la mitad de las pacientes positivas en ER no respondieron al tratamiento endocrino, un fenómeno asociado a la transformación maligna del receptor en lesiones cancerosas.⁸ La sobreexpresión del PR puede servir para caracterizar aún más el tumor de mama y predecir la respuesta al tratamiento, ya que actúa como detector en la evaluación del estado funcional del ER.^{8,9} En 1975 se estableció la hipótesis de que la sobreexpresión del PR puede actuar como un marcador predictivo de la respuesta a la terapia endocrina.⁸ Los estudios que se llevaron a cabo posteriormente confirmaron el valor del PR en las predicciones y el pronóstico.^{10,11} Un nivel más elevado de la expresión del PR puede indicar una respuesta más eficaz a la terapia endocrina.¹⁰

La detección del PR es el pilar fundamental en el que se sostiene el control de las pacientes con carcinoma de mama invasivo.^{5,6,9} Las directrices y las prácticas recomendadas hacen hincapié en que la inmunohistoquímica (IHC) es el método más adecuado para detectar el PR en el cáncer de mama.⁹ Por lo tanto, la detección mediante IHC del PR con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) puede servir de ayuda a la hora de controlar, pronosticar y predecir el resultado del tratamiento del carcinoma de mama.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se une al PR en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecte inmunoglobulinas de conejo, seguida de la incorporación de un conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) estreptavidina (VIEW DAB Detection Kit) o mediante un conjugado de anticuerpo secundario y peroxidasa de rábano (HRP) (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática.

Los casos clínicos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o de útero positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2), se debe teñir un segundo portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción nuclear de las células tumorales o de las glándulas uterinas y el estroma. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portaobjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama negativo en PR) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) (n.º cat. 790-2223) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) contiene aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno PR humano.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) (n.º cat. 790-4296) contiene reactivo suficiente para 250 pruebas.

Un dispensador de 25 mL de anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) contiene aproximadamente 25 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno PR humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón formado por Tris-HCl con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.1 %, un conservante. Existen trazas (~0.2 %) de suero bovino fetal con origen en Estados Unidos de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 1 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) es un anticuerpo monoclonal de conejo producido como sobrenadante de cultivo celular.

Consulte en la hoja de datos correspondiente del kit de detección de VENTANA las descripciones detalladas de: Principio del procedimiento, Material y métodos, Recogida y

preparación de muestras para análisis, Procedimientos de control de calidad, Resolución de problemas, Interpretación de los resultados y Limitaciones.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. View DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001)
5. Endogenous Biotin Blocking Kit (n.º cat. 760-050 / 05266092001)
6. ultraView Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning 1 (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH
16. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. Para procesar las muestras, se recomienda seguir los pasos que aparecen a continuación.¹²

Coloque la muestra en formol tamponado neutro al 10 %. La cantidad usada es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C).

Después de la fijación, la muestra debe colocarse en un instrumento de procesamiento de tejidos para prepararla durante la noche. En resumen, el proceso consiste en deshidratar la muestra con alcoholes y, a continuación, eliminar estos mediante reactivos de aclarado para finalmente llevar a cabo la infiltración con parafina.

Las muestras se emben en parafina en casetes de tejido y se cortan secciones de aproximadamente 4 µm de grosor que se centran y se recogen en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. El tejido deberá dejarse secar al aire colocando los portaobjetos a temperatura ambiente durante la noche o en un horno a 60 °C durante 30 minutos.

Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
3. Solo para uso profesional.
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
6. Este producto contiene un 1 % de suero bovino o una cantidad menor, que se utiliza en la producción del anticuerpo.
7. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
8. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{13,14}
9. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
10. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
11. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en dialog.roche.com.
12. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
13. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
14. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Normativa (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
 Advertencia	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
	P273	Evitar su emisión al medio ambiente.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, masa reactiva de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte Tabla 2 y Tabla 3 para ver los protocolos de tinción recomendados.

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con número de referencia 790-4509 o 790-4296.

La verificación y validación de los protocolos de tinción recomendados en cada kit de detección se demuestran mediante las pruebas de control de diseño y los resultados de estudios clínicos.

Cualquier modificación que se realice en los procedimientos de tinción recomendados anulará las características de rendimiento que se suministran en esta hoja de datos. El usuario deberá validar todas las modificaciones que realice en el procedimiento de tinción recomendado.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con *ultraView Universal DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

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

Tabla 3. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con *MIEW DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Estándar
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Bloque A/B (Bloqueador de biotina)	Necesario	Necesario
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Control de tejido positivo

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos y los instrumentos, y no como ayuda para

establecer un diagnóstico específico de las muestras de prueba. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Es necesario incluir un control de tejido positivo en cada sesión de procedimiento de tinción que se lleve a cabo. El CAP recomienda que el control de tejido positivo se encuentre en el portaobjetos de la paciente.⁹ Como ejemplo de control de tejido positivo para el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se encuentra el carcinoma de mama positivo débil. Las células o componentes de tejido con tinción positiva (tinción nuclear de células tumorales) se utilizan para confirmar que el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se ha aplicado y que el instrumento ha funcionado correctamente. El tejido de control puede contener células o elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra extraída recientemente de autopsia, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se utilizarán para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actuará como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos.

Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. La opción más idónea es elegir un tejido de carcinoma de mama, que se caracteriza por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC.

Si no es posible, se puede utilizar endometrio proliferativo normal humano como control positivo. Los componentes de tinción positiva son la tinción nuclear de epitelios glandulares y células estromales y de músculo liso. Es posible, no obstante, que la tinción del tejido endometrial no sea lo suficientemente débil para detectar niveles bajos de degradación de los reactivos o problemas con la metodología IHC.

Control tisular negativo

Con un control tisular que se haya fijado, procesado y embebido de la misma forma que las muestras del paciente se puede verificar en cada sesión de tinción la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) para detectar el PR, así como proporcionar una indicación sobre una tinción de fondo específica (falsos positivos en la tinción). Además, incluir una variedad de tipos de células diferentes en la mayor parte de las secciones de tejido puede servir como control negativo para comprobar las especificaciones de rendimiento del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2). Por ejemplo, el mismo tejido (endometrio) que se utiliza como control de tejido positivo puede servir como control de tejido negativo. Los componentes que no van a tener tinción, como el citoplasma y la membrana celular, deberían mostrar la ausencia de una tinción específica en aquellas células que no está previsto que se tiñan, facilitando una indicación sobre la tinción de fondo específica. El control de tejido negativo también puede servir de ayuda en la interpretación de los resultados. La variedad de los diferentes tipos de células presentes en la mayor parte de las secciones de tejido suele ofrecer puntos de control negativo, pero es necesaria su comprobación por parte del usuario. Si se presenta una tinción específica en los puntos de control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

Control de reactivo negativo

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. El control de reactivo negativo se utiliza en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica y permitir que se interprete de forma más precisa la tinción específica en el sitio del antígeno. Todo ello indica la tinción de fondo no específica en cada portaobjetos. En lugar del anticuerpo primario, tiña el portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig, una IgG purificada de conejo no inmune que no reacciona con muestras humanas. Si se utiliza un control de reactivo negativo diferente, dilúyalo con VENTANA Antibody Diluent en la misma proporción de dilución que el antisuero del anticuerpo primario. En el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) existe una retención de aproximadamente el 0.2 % de suero bovino fetal. También se considera adecuada la incorporación de un 0.2 % de suero bovino fetal al VENTANA Antibody Diluent para usarlo como control de reactivo negativo no específico. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, la presencia de un control de reactivo negativo en un portaobjetos puede servir como control de fondo de unión no específica o negativa de otros anticuerpos.

Verificación del ensayo

Antes de usar por primera vez el anticuerpo en un procedimiento diagnóstico, o ante un cambio de lote, es necesario comprobar la especificidad del anticuerpo llevando a cabo una tinción de varios tejidos negativos y positivos cuyas características de rendimiento se conocen de antemano. Consulte los procedimientos de control de calidad que se han mencionado previamente en esta sección del prospecto y las recomendaciones de control de calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, la Anatomic Pathology Checklist o la CLSI Approved Guideline, o todos los documentos.^{16,17} Estos procedimientos de control de calidad deberían repetirse cada vez que se utilice un lote de anticuerpo nuevo, cuando se cambie el número de lote de uno de los reactivos del conjunto correspondiente o se modifiquen los parámetros del ensayo. El control de calidad no se puede llevar a cabo de forma significativa en un reactivo independiente de manera aislada, ya que los reactivos correspondientes, así como el protocolo del ensayo, se deben probar al mismo tiempo antes de utilizar un kit con fines de diagnóstico. Los tejidos que se enumeran en el Resumen de resultados previstos son aptos para llevar a cabo la verificación del ensayo.

Es necesario llevar a cabo todos los procedimientos de control de calidad de acuerdo con las normativas locales, estatales y federales o con los criterios de acreditación.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de tinción provoca que un producto de reacción con color se precipite en los sitios del antígeno que localiza el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de IHC debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados. El estado del receptor de progesterona se determina mediante el porcentaje de células tumorales con tinción. Para considerar que el resultado de un caso es positivo en PR, debe observarse una tinción en el núcleo de las células tumorales igual o superior al 1%.⁹

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) debería estudiarse primero para comprobar que los reactivos funcionan correctamente. La existencia de un producto de reacción marrón (3,3'-tetracloruro de diaminobencidina, DAB) en los núcleos de las células diana indica una reactividad positiva. Como ejemplo de tejidos que pueden servir como control positivo se encuentra el carcinoma de mama positivo débil conocido, es decir, $\geq 1\%$. Los núcleos de las células tumorales deberían ser positivos. Es obligatorio considerar positiva únicamente la tinción nuclear si se quiere evitar la interpretación errónea de falsos positivos. También es posible utilizar el endometrio humano normal. En el caso del endometrio normal, la tinción del PR se observa en los núcleos de las glándulas y el estroma endometriales. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Control tisular negativo

El control de tejido negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. El carcinoma de mama que se utiliza como control positivo también puede servir como tejido de control negativo. Ciertos elementos estromales, como las células endoteliales, cuya tinción negativa en PR se ha demostrado, no deberían presentar tinción nuclear. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjuntivo en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que en las células necróticas o degeneradas se suele observar una tinción no específica.¹⁸

Tejido del paciente

La tinción de muestras del paciente con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se debe estudiar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Es posible detectar PR entre otras neoplasias, como el cáncer de ovario y de endometrio.¹⁹ La morfología de cada muestra de tejido también se deberá estudiar a través de una sección con tinción de hematoxilina y eosina cuando se esté interpretando cualquier resultado de inmunohistoquímica. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado.

Para obtener más información sobre la inmunoreactividad, consulte las secciones Resumen y explicación, Limitaciones y Resumen de los resultados previstos.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica (IHC) es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser consecuencia de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Está previsto que este anticuerpo se use en un panel de anticuerpos. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para preparar la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
5. Ventana proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.
7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.²⁰ Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.²¹
9. Cuando se utilizan en los pasos de bloqueo, el suero normal de la misma fuente animal que el antisuero secundario pueden dar lugar a resultados de tinción falsos positivos o falsos negativos debido a la existencia de autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
10. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.¹⁸
11. Como ocurre en todas las pruebas de IHC, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

Limitaciones específicas

1. El anticuerpo, cuando se utiliza junto con los kit de detección y los accesorios VENTANA, detecta el antígeno que permanece una vez se han llevado a cabo la

fijación en formol, el procesamiento del tejido y el corte. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

- Un resultado negativo con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) no descarta la presencia del PR. Las reacciones negativas en los carcinomas de mama pueden ser consecuencia de la pérdida de la expresión del antígeno o de una marcada reducción de esta. Se recomienda, por tanto, que se utilice el anticuerpo como parte de un panel que incluya el receptor de estrógeno.
- Se ha observado la presencia de tinción nuclear positiva con el clon del anticuerpo 1E2 en tejido de amígdala.²² El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) no está indicado para su uso con la amígdala. Por tanto, si se recurre al tejido de amígdala como control tisular negativo, es necesario analizar los tejidos de amígdala para garantizar que se selecciona un caso de tinción negativo.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinaron mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos normales. Los resultados se resumen en la Tabla 4 y la Tabla 5. Se observó tinción nuclear positiva en todos los tejidos estudiados, con la única excepción del tejido de ovario, que presentó una tinción negativa imprevista. También se observó la presencia de tinción positiva en tejido tiroideo, algo que se había detectado ya anteriormente.²³ La tinción nuclear positiva con el clon del anticuerpo 1E2 ya se había visto en tejido de amígdala.²²

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/5	Esófago	0/3
Cerebelo	0/3	Estómago	0/3
Glándula suprarrenal	0/3	Intestino delgado	0/3
Ovario	2/3	Colon	0/3
Páncreas	3/3	Hígado	0/3
Glándula paratiroidea	0/4	Glándula salival	0/3
Glándula pituitaria	3/3	Riñón	0/3
Testículos	0/3	Próstata	1/3
Tiroides	0/5	Vejiga	0/5
Mama ^a	4/4	Endometrio	1/3
Bazo	1/3	Cuello del útero	8/8
Amígdala	1/3	Músculo esquelético	0/5
Timo	0/3	Piel	0/3
Médula ósea	0/3	Nervio	0/3
Pulmón	0/3	Mesotelio	0/3
Corazón	0/3		

^a Entre los tejidos había tejido fibroadiposo.

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos neoplásicos. Los casos se consideraron positivos en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	1/1
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	1/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	1/1
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	0/1
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	0/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	1/1
Carcinoma urotelial (uretra prostática)	1/1
Leiomioma (útero)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Adenocarcinoma (útero)	1/2
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	1/1
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células escamosas (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Neurofibroma (mediastino)	1/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Linfoma, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	0/1

La sensibilidad depende de la conservación del antígeno. El manejo incorrecto del tejido durante la fijación, el seccionado, la inclusión o el almacenamiento puede modificar la antigenicidad y debilitar la capacidad de detección del PR que tiene el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Precisión de los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad, se realizó la tinción de seis casos de tejidos independientes. De los seis tejidos, dos presentaban una elevada expresión del PR; en dos se observaba una expresión reducida del PR y los otros dos daban resultado negativo en PR en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 %; y expresión elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de 9 portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordó al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordó al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark XT, se realizó la tinción de 4 portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark XT independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark XT concordó al 100 % en los seis casos.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA, se realizó la tinción de 4 portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark ULTRA independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA concordó al 100 % en los seis casos.

Todas las pruebas de reproducibilidad cumplieron los criterios de aceptación para que el resultado fuera apto.

Precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de nueve casos de tejidos independientes. De los nueve tejidos, tres presentaban una elevada expresión del PR; en tres se observaba una expresión reducida del PR y los otros tres daban resultado negativo en PR en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 %; y expresión elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de cinco portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La concordancia de la repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS fue del 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS concordó al 97.8 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA PLUS, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS fue del 98.1 %.

Reproducibilidad entre laboratorios

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) con una sesión de 14 portaobjetos de cáncer de mama (8 positivos, 2 con positividad reducida y 4 negativos) en 3 instrumentos BenchMark XT y 3 instrumentos BenchMark ULTRA, con detección mediante MIEW DAB y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit en cada uno de los 5 días no consecutivos durante un periodo mínimo de 20 días en 3 laboratorios externos. Las muestras se asignaron de forma aleatoria y fueron evaluadas por 6 anatomopatólogos (2 por cada centro) para obtener el porcentaje de células tumorales con tinción. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, el 1 % de las células tumorales invasivas.⁹

En cuanto a la precisión entre centros, los porcentajes del promedio de concordancia positiva (APA) y del promedio de concordancia negativa (ANA) en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.6 % y 95.4 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.4 % y del 98.4 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del 97.4 % y 91.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre días, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.5 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.3 % y 98.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del 97.0 % y 90.8 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre lectores, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) fueron del 99.7 % y 99.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante MIEW; del 98.6 % y 95.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit; del 99.3 % y 98.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante MIEW; y del

98.6 % y 95.1 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

En cuanto a la precisión entre plataformas en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, los porcentajes de APA y ANA fueron del 99.5 % y 98.7 %, respectivamente, con detección mediante *VIEW*; y del 98.0 % y 93.9 %, respectivamente, con detección mediante el *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

Con respecto a la precisión dentro de la misma plataforma, los porcentajes de APA y ANA fueron del 98.7 % y 96.4 %, respectivamente, con el instrumento BenchMark ULTRA; y del 97.4 % y 92.6 %, respectivamente, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Comparativa entre el *VIEW* DAB Detection Kit y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se utilizó para llevar a cabo una prueba comparativa de detección entre dos instrumentos (BenchMark XT y BenchMark ULTRA) con el *VIEW* DAB Detection Kit y el *ultraView* Universal DAB Detection Kit. La prueba se realizó con ciento noventa y nueve casos de tejido. Del total, aproximadamente la mitad eran positivos y la otra mitad negativos en función del porcentaje de células tumorales que presentaba tinción. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales.

El índice de aceptabilidad de la morfología y del fondo fue del 100 % tanto en los kits de detección como en los instrumentos, salvo en el caso del *ultraView* Universal DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA, cuyo índice de aceptabilidad del fondo fue del 99.5 %. Las comparaciones directas de las evaluaciones clínicas positivas y negativas entre los kits de detección en cada una de las plataformas se muestran en la Tabla 6, en el caso del instrumento BenchMark ULTRA, y en la Tabla 7, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Tabla 6. Evaluación clínica de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit con el instrumento BenchMark ULTRA.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	94	11	105
Negativa	2	86	88
Total	96	97	193
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	94/96	97.9 (92.7-99.4)	
Porcentaje de concordancia negativa	86/97	88.7 (80.8-93.5)	
Porcentaje de concordancia global	180/193	93.3 (88.8-96.0)	

Tabla 7. Evaluación clínica de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit con el instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	91	14	105
Negativa	2	86	88
Total	93	100	193
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	91/93	97.8 (92.5-99.4)	

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Porcentaje de concordancia negativa	86/100	86.0 (77.9-91.5)	
Porcentaje de concordancia global	177/193	91.7 (87.0-94.8)	

La concordancia de la evaluación clínica entre los kits de detección en ambos instrumentos estuvo por encima del 90 %: un 93.3 % (n = 193) y un 91.7 % (n = 193) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, respectivamente. El *ultraView* Universal DAB Detection Kit, en comparación con el *VIEW* DAB Detection Kit, obtuvo un índice de concordancia en la puntuación de la tinción del 90.2 % (n = 193) y del 85.5 % (n = 193).

Comparación del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS frente al instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron ciento treinta y cuatro (134) casos de tejido de carcinoma de mama (61 positivos en PR, 61 casos negativos en PR y 12 casos en el límite de positividad en PR) que reflejaban el rango clínico del ensayo. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, una cifra ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.⁹ La comparación directa del estado positivo y negativo en PR entre el instrumento BenchMark ULTRA y el instrumento BenchMark ULTRA PLUS se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA (sin incluir los casos en el límite de positividad).

Instrumento BenchMark ULTRA PLUS	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	79	2	81
Negativa	6	23	29
Total	85	25	110
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	79/85	92.9 (85.4-96.7)	
Porcentaje de concordancia negativa	23/25	92.0 (75.0-97.8)	
Porcentaje de concordancia global	102/110	92.7 (86.3-96.3)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 97.2%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 97.2%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y FLEX anti-PR (PgR 636).

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado en múltiples centros y con lector múltiple para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT con el de Dako FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor Clone PgR 636 Ready-To-Use (FLEX anti-PR (PgR 636)) en un instrumento Dako Autostainer Plus. La biotina endógena, en el caso de los instrumentos BenchMark IHC/ISH, se bloqueó con VENTANA Endogenous Biotin Blocking Kit. El anticuerpo se detectó con el *VIEW* DAB Detection Kit. En la plataforma

Dako, la detección del anticuerpo se realizó mediante EnVision Flex, High pH. El rango clínico del ensayo estaba representado por aproximadamente 120 casos de cáncer de mama negativos y 216 casos positivos, que se asignaron aleatoriamente a los tres sitios que llevarían a cabo el estudio, de forma que cada uno de ellos recibiese la misma cantidad de casos y que los casos representasen cada una de las categorías de evaluación clínica. Cada sitio se ocupó de la tinción de los casos asignados con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA, en un instrumento BenchMark XT con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) y en un instrumento Dako Autostainer Plus con FLEX anti-PR (PgR 636). Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideró positivo en PR cuando se observó tinción del núcleo en, al menos, una cifra ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.⁹

Tabla 9. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA y FLEX anti-PR (PgR 636) en Dako Autostainer Plus.

Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)	FLEX anti-PR (PgR 636)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	200	7	207
Negativa:	9	104	113
Total:	209	111	320
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	200/209	95.7 (92.0-97.7)	
Porcentaje de concordancia negativa	104/111	93.7 (87.6-96.9)	
Porcentaje de concordancia global	304/320	95.0 (92.0-96.9)	

Tabla 10. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark XT y FLEX anti-PR (PgR 636) en el Dako Autostainer Plus.

Anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2)	FLEX anti-PR (PgR 636)		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	186	9	195
Negativa:	18	100	118
Total:	204	109	313
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	186/204	91.2 (86.5-94.3)	
Porcentaje de concordancia negativa	100/109	91.7 (85.0-95.6)	
Porcentaje de concordancia global	286/313	91.4 (87.7-94.0)	

En el caso de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, en comparación con FLEX anti-PR (PgR 636) en un Dako Autostainer Plus, los índices de concordancia global, positiva y negativa (obtenidos en todos los centros) fueron superiores al 90 %.

Tabla 11. Comparación entre el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark ULTRA y el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en un instrumento BenchMark XT.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva:	184	12	196
Negativa:	6	105	111
Total:	190	117	307
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	184/190	96.8 (93.3-98.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	105/117	89.7 (82.9-94.0)	
Porcentaje de concordancia global	289/307	94.4 (90.9-96.3)	

En el caso de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) en el instrumento BenchMark ULTRA, en comparación con el instrumento BenchMark XT, los índices de concordancia global, positiva y negativa fueron superiores al 89 %.

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 99.7 % (C.I. del 95 %: 98.3 %-99.9 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 96.1 % (C.I. del 95 %: 93.5 %-97.7 %) en el del instrumento BenchMark XT. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 99.4 % (C.I. del 95 %: 97.9 %-99.8 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 95.2 % (C.I. del 95 %: 92.4 %-97.0 %) en el del instrumento BenchMark XT.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el portaobjetos se ha etiquetado correctamente, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
- Si la tinción de fondo es excesiva, es posible que se observen niveles elevados de biotina endógena. Debería incorporarse un paso de bloqueo de la biotina.
- Si no se ha eliminado toda la parafina, repita el proceso de desparafinado.
- Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, repita la sesión reduciendo el tiempo de incubación del anticuerpo primario en intervalos de 4 minutos para obtener la intensidad de tinción deseada.
- Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
- Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento paso a paso del Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

- Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ. Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2008;18(1):11-33.
- Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol*. 2016;428(19):3831-3849.
- Tanos T, Rojo L, Echeverria P, et al. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):210.
- Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):444-457.

5. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2019.
6. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24(9):2206-2223.
7. Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. Rev Endocr Metab Disord. 2007;8(3):229-239.
8. Horwitz KB, McGuire WL. Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. Science. 1975;189(4204):726-727.
9. Hammond ME, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2010;134(6):907-22.
10. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. J Clin Oncol. 2003;21(10):1973-1979.
11. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol. 1992;10(8):1284-1291.
12. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
13. Occupational Safety and Health Standard: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
14. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
15. Roche PC, His ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
16. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
17. 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.
18. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
19. Press MF, Greene GL. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. Endocrinology. 1988;122(3):1165-1175.
20. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
21. 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.
22. Guadagno E, De Rosa G, Nappi O. A National Quality Assurance Program for Breast Immunohistochemistry: An Italian Perspective. Pathologica. 2018;110(2):83-91.
23. Money SR, Muss W, Thelmo WL, et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in human thyroid. Surgery. 1989;106(6):975-8.

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

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

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

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificador único del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el dispositivo médico a la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
F	Se han actualizado las secciones Preparación de muestras, Procedimiento de tinción, Rendimiento de análisis, Propiedad Intelectual e Información de contacto. Se ha añadido el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

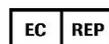
© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.rocke.com



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



Farm. ROBERTA MILLOZZA
PRODUCOS ROCHÉ S.A.C.e.I.
Division Diagnostica
DT & APODERADA LEGAL

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

REF 790-2991

05278368001

IVD Σ 50

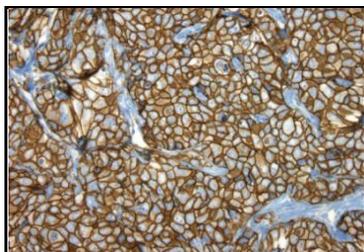


Figura 1. Tinción del carcinoma de mama con el anticuerpo PATHWAY HER2 (4B5).

USO PREVISTO

PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (PATHWAY HER2 (4B5)) de Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) es un anticuerpo monoclonal de conejo destinado a su uso en laboratorio para la detección semicuantitativa del antígeno HER2 en secciones de tejido normal y neoplásico fijado con formol y embebido en parafina con una tinción posterior mediante un instrumento BenchMark IHC/ISH. Está indicado

como ayuda para la evaluación de pacientes con cáncer de mama para las que se está planteando la aplicación de un tratamiento con Herceptin® (trastuzumab) o KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansina).

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

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

Nota: Todas las pacientes que formaban parte de ensayos clínicos con Herceptin se seleccionaron mediante un ensayo clínico. No se seleccionó a ninguna paciente en los ensayos mediante PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5). Se llevó a cabo una comparación entre PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) y PATHWAY HER-2 (clon CB11) Primary Antibody en un conjunto de muestras independientes que confirmó la obtención de resultados de concordancia aceptables. La correlación real de PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) con los resultados clínicos no se ha establecido hasta el momento.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5)) es un anticuerpo monoclonal de conejo generado contra el dominio interno del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano transmembrana (HER2). La clonación y la caracterización de HER2 corresponden a Akiyama, et al en el año 1986.¹ El clon 4B5 ha demostrado su reacción a la proteína de 185 kD de los lisados celulares de SK-BR-3 mediante la técnica Western blotting. SK-BR-3 es una estirpe celular del carcinoma de mama con una sobreexpresión de 128 del mRNA de HER2.² El tamaño de la banda que se ha identificado se corresponde adecuadamente con el confirmado por Akiyama et al en el caso de la proteína HER2 (185 kD).¹ Los experimentos de inmunohistoquímica (IHC) con líneas celulares transfectadas (HEK293) han demostrado que el clon 4B5 tiene las células transfectadas con HER2 y con HER4. No se ha observado la tinción de células transfectadas con HER1 ni con HER3. Los datos de la técnica Western blotting con una proteína recombinante HER4 también sugieren que el clon 4B5 detecta el epítipo HER4. HER2 es un receptor transmembrana de tirosina quinasa de unos 185 kDa con una estructura parecida a la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).^{3,4} La amplificación del gen y la correspondiente sobreexpresión de HER2 se ha observado en una variedad de tumores, como los carcinomas de mama.^{3,4,5} La sobreexpresión de proteína, inducida por la amplificación del gen HER2, es la causa principal de la carcinogénesis inducida por HER2.³ El exceso de la expresión de la proteína HER2 en la membrana celular aumenta la señal de transducción, con la consecuente hiperactivación de la proliferación y la diferenciación que, en último término, provoca la formación de tumores.^{3,4}

Entre el 15 y el 30 por ciento de los casos de cáncer ductal invasivo de mama obtienen resultados positivos a la sobreexpresión de proteína HER2 y/o la amplificación del gen.^{6,7}

En casi todos los casos de enfermedad de Paget de mama y en hasta un 90 por ciento de los casos de carcinoma ductal in situ de tipo comedo el resultado es positivo.^{6,8}

IMPORTANCIA CLÍNICA

El cáncer de mama es el carcinoma más habitual en mujeres y es la segunda causa de mortalidad por cáncer.^{4,6} En Norteamérica, la probabilidad de una mujer de desarrollar cáncer de mama es de una entre ocho.⁴ La detección temprana y los tratamientos adecuados tienen una importante repercusión en la supervivencia global.^{9,10} Las muestras pequeñas de tejido se pueden utilizar fácilmente en los análisis mediante IHC rutinarios, lo que aporta a esta técnica, junto con los anticuerpos que detectan los antígenos, suma importancia en la interpretación del carcinoma y la convierte en una herramienta eficaz para el anatomopatólogo a la hora de llevar a cabo el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. HER2 es un marcador crucial actualmente para el cáncer de mama.¹¹⁻¹⁴

Los fármacos terapéuticos Herceptin (trastuzumab) y KADCYLA (ado-trastuzumab emtansina/trastuzumab emtansina) han demostrado buenos resultados en algunas pacientes con carcinoma de mama al detener, y en algunos casos revertir, el crecimiento del cáncer.^{9,14} Los fármacos son anticuerpos monoclonales humanizados que se unen a la proteína HER2 en las células cancerosas.^{11,13,14} Los tratamientos con Herceptin o KADCYLA únicamente dan resultado con pacientes que han demostrado positividad a HER2.¹¹⁻¹⁴ El diagnóstico in vitro dirigido a evaluar el estado de HER2 en los carcinomas de mama es de suma importancia para ayudar al médico a decidirse por el tratamiento con Herceptin o KADCYLA.^{11,12,14} La detección mediante IHC de la expresión de la proteína HER2 sirve como ayuda en la evaluación de las pacientes con cáncer de mama para las que se plantean los tratamientos con Herceptin o KADCYLA.

En la interpretación de los resultados de cualquier sistema de detección de HER2 se debe tener en cuenta el hecho de que la expresión de HER2 se observa tanto en los tumores del cáncer de mama como en el tejido sano, aunque con diferentes niveles y distintos patrones de expresión.¹⁵ La preparación de los tejidos histológicos deja la morfología del tejido intacta, lo que supone una ventaja que contribuye a la interpretación de la positividad a HER2 de la muestra. La interpretación de todas las pruebas histológicas debería estar a cargo de especialistas en la morfología del cáncer de mama o anatomopatólogos y los resultados deberían complementarse con otros estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otros datos clínicos y de laboratorio.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

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

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

su uso, y *ultraView* Universal DAB Detection, junto con un instrumento BenchMark IHC/ISH, reduce la posibilidad de cometer errores humanos y la variabilidad inherente que dan como resultado una dilución individual del reactivo, el pipeteado manual y la aplicación manual del reactivo.

MATERIAL SUMINISTRADO

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

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

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

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 6 µg/mL.

El anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) es un IgG de conejo diluido de sobrenadantes de cultivo tisular.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio, Superfrost Plus (VWR, n.º de cat. 48311-703 o equivalentes)
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. MIEW DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001)
5. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Medio de montaje permanente
15. Cubreobjetos de cristal
16. Montador automático
17. Equipo de laboratorio de uso general
18. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

De forma habitual, los tejidos FFPE que se procesan, resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y el instrumento BenchMark IHC/ISH. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. El fijador de

tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %.¹⁶ La cantidad que debe utilizarse es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C).¹⁶

Los tejidos con expresión del antígeno que se han fijado y embebido correctamente conservarán su estabilidad durante al menos 2 años si se almacenan en un lugar fresco (entre 15 y 25 °C). En la ley Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) de 1988, 42CFR493.1259 (b), se exige que «El laboratorio debe conservar los portaobjetos teñidos durante al menos diez años desde la fecha de estudio y los bloques de muestras durante al menos dos años a partir de la fecha de estudio».

Es necesario cortar secciones de tejido de un grosor aproximado de 5 µm y recogerlas en el portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. El tejido deberá dejarse secar al aire colocando los portaobjetos a temperatura ambiente durante la noche.¹⁷ Los estudios de Ventana sugieren que las secciones de tejido y las de líneas celulares que se dejan secar al aire y se conservan a una temperatura de entre 2 y 8 °C se mantienen estables durante al menos 6 meses. En cada laboratorio se deberá validar la estabilidad del corte del portaobjetos en función de sus propios procedimientos y de sus condiciones del entorno de conservación.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. **No utilizar por encima del número especificado de ensayos.**
5. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
6. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{18,19}
7. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
8. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
9. Si se utiliza tal y como se indica en las instrucciones, este producto no se clasifica como una sustancia biopeligrosa. El conservante del reactivo es ácido sódico. Los indicios de sobreexposición a esta sustancia pueden ser, entre otros, irritación en la piel y los ojos e irritación en las membranas mucosas y las vías respiratorias altas. La concentración de ácido sódico que contiene este producto es 0.05 % y no cumple los criterios necesarios para clasificarla como sustancia peligrosa. La acumulación de Na₃ puede reaccionar con los componentes de plomo y cobre de las tuberías y generar ácidos metálicos extremadamente explosivos. Cuando se vaya a eliminar, añada grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de ácidos en las tuberías.²⁰ Es posible que se presenten reacciones alérgicas sistémicas en personas con mayor sensibilidad.
10. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en dialog.roche.com.
11. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
12. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
13. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios.

Consulte las tablas que aparecen a continuación para ver los protocolos de tinción recomendados. El anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) se ha homologado para su uso en EE. UU. con el procedimiento de tinción PATHWAY en los protocolos recomendados.

Este anticuerpo se ha optimizado para periodos de incubación específicos, pero el usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo. El anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) debería permanecer, al menos, 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso.

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 790-2991.

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

Tipo de procedimiento	Método		
	BenchMark	XT	ULTRA
Horneado	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento o del antígeno)	CC1, Estándar	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Suave
Anticuerpo (Primario)	32 minutos, 37 °C	32 minutos, 37 °C	24 minutos, 36 °C
A/B Blocking (Biotin Blocking)	Necesario		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

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

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Procedimiento de tinción:	XT <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5	U <i>ultraView</i> PATHWAY HER2 4B5
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento o del antígeno)	CC1, Suave	ULTRA CC1, Suave
Enzima (Proteasa)	No es necesario	No es necesario
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	

Tabla 3. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) con *ultraView* Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH mediante el procedimiento de tinción *ultraView*.

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA o ULTRA PLUS
Procedimiento de tinción:	XT <i>ultraView</i> v3	U <i>ultraView</i> DAB
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	Cell Conditioning 1, Suave	ULTRA CC1, Suave
Enzima (Proteasa)	No es necesario	No es necesario
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
<i>ultraWash</i>	Seleccionado	Seleccionado
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».²¹

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

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

Como ejemplos de tejidos de control positivo para este anticuerpo se encuentran los tejidos de carcinoma de mama positivo débil.

Controles del sistema de líneas celulares

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

Farm. ROBERTA MILE MOZZA
 PRODUTTI ROCHES S.A. s.r.l.
 Divisione Diagnostica
 DT & APOCIBAD/LEGAL

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

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

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

Control de tejido positivo

Se debe utilizar un tejido de control positivo que se haya fijado y procesado de la misma forma que las muestras del paciente con cada conjunto de condiciones de la prueba y en cada uno de los procedimientos de tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) que se lleven a cabo. El tejido de control puede contener células o componentes de tinción tanto positiva como negativa del tejido y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra extraída recientemente de autopsia, biopsia o cirugía preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se utilizan para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actúa como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y preparación de tejidos. Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. La opción más idónea es elegir un tejido que se caracterice por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC. Sin embargo, habitualmente los tejidos neoplásicos positivos en HER2 suelen dar como resultado una tinción positiva fuerte dada la naturaleza de la patología (sobreexpresión). Como ejemplo de tejido de control positivo para el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) se encuentra el tejido de carcinoma de mama invasivo con positividad débil conocida en HER2 (como el ductal o lobulillar). Los componentes de tinción positiva del tejido (membranas de células neoplásicas) sirven para comprobar que el anticuerpo se ha aplicado y el instrumento ha funcionado correctamente.

El tejido de carcinoma de mama invasivo con positividad débil conocida en HER2 puede contener células o elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los reactivos de la prueba y los tejidos procesados y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente.

Control tisular negativo

El mismo portaobjetos de tejido que se utiliza como control de tejido positivo (carcinoma de ductal o lobulillar invasivo de mama) puede servir como control tisular negativo. En los componentes sin tinción (como el estroma, las células linfáticas y los vasos sanguíneos circundantes) debería observarse una absoluta ausencia de tinción específica y deberían ofrecer una indicación sobre la tinción de fondo específica con el anticuerpo primario. Con un control tisular que se haya fijado, procesado y embebido de la misma forma que las muestras de la paciente se puede verificar en cada sesión de tinción la especificidad del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5), así como proporcionar una indicación sobre una tinción de fondo específica (falsos positivos en la tinción).

Control de reactivo negativo

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

Discrepancias no explicadas

Las discrepancias no explicadas en los controles deberían comunicarse al representante local de asistencia técnica de Roche de forma inmediata. Si los resultados de los

controles de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no serán válidos. Consulte la sección Resolución de problemas. Identifique el problema y corríjalo; a continuación, repita las muestras del paciente.

Verificación del ensayo

Antes de comenzar a utilizar un anticuerpo o un sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, se debe comprobar la especificidad del anticuerpo mediante pruebas en una serie de tejidos que contengan características de rendimiento en inmunohistoquímica conocidas y que reflejen tejidos positivos y negativos conocidos (consulte la sección Procedimientos de control de calidad que se ha mencionado anteriormente y que se encuentra en la hoja de datos del producto y las recomendaciones sobre control de calidad de College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²², CLSI Approved Guideline²³ o todos ellos). Estos procedimientos de control de calidad se deberían repetir con cada lote nuevo de anticuerpo o siempre que se cambien los parámetros del ensayo. Los tejidos de cáncer de mama con un estado de HER2 conocido son adecuados para la verificación del ensayo.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

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

Controles positivos

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

Controles tisulares negativos

El control tisular negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se lleva a cabo una contratinción del tejido, es posible que se observe tinción alrededor de la parte exterior de la célula, como en los espacios intersticiales. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

Controles de reactivo negativo

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

Tejido del paciente

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

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

Convenciones de puntuación para la interpretación del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5)

Para que los carcinomas de mama se consideren positivos en la sobreexpresión de proteína HER2, deben cumplir los criterios límite en cuanto a la intensidad de la tinción (2+ o superior en una escala de 0 a 3+) y al porcentaje de células tumorales positivas (superior al 10 %). La tinción debe localizarse, además, en la membrana celular. Podría observarse una tinción citoplasmática, pero esta tinción no debe incluirse en los criterios de establecimiento de la positividad. La región del tejido con una tinción adecuada y bien conservada debe estudiarse para evaluar la intensidad de la tinción y determinar la integridad de la tinción de membrana. A una tinción que rodea por completo la membrana citoplasmática debería asignarse una puntuación de intensidad de «2+» o de «3+». A la tinción parcial de la membrana se debería asignar la puntuación «1+». Es posible que sea necesario estudiar los casos límite con un aumento de 40x o superior para poder discernir entre las intensidades de «1+» y «2+». A diferencia de los casos con una puntuación de intensidad «3+», las puntuaciones de tinción «2+» contienen un anillo con una delineación muy clara y nítida, mientras que los casos con puntuaciones «3+» presentan un perfil mucho más grueso. A continuación, en la Tabla 5, se encuentra una referencia rápida sobre los criterios de tinción. Consulte la Guía de interpretación de PATHWAY anti-HER2 (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody para obtener una descripción más detallada con imágenes de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Tabla 5. Criterios de intensidad y patrón de la tinción de membrana celular con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Patrón de tinción	Puntuación (para informar al facultativo responsable del tratamiento del paciente)	Evaluación de la tinción HER2
No se observa tinción de membrana	0	Negativa
Tinción difusa y parcial de la membrana en cualquier proporción de células cancerosas	1+	Negativa
Tinción débil completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	2+	Positivo débil*
Tinción intensa completa de la membrana con un porcentaje de células cancerosas superior al 10 %	3+	Positiva

*Se recomienda reflejar en ISH

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser el resultado de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los

controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para interpretar la preparación de la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.

5. VENTANA proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.
7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.²⁴ Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis b (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.²⁵
9. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.²⁶
10. Como ocurre en todas las pruebas de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Este anticuerpo se ha optimizado, tal y como se indica en las tablas Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3, para los instrumentos BenchMark IHC/ISH y las sustancias químicas de detección. Es posible que sea necesario incrementar o reducir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales por las variaciones que se dan en la fijación y el procesamiento de los tejidos. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».²¹

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

Los portaobjetos deberían teñirse inmediatamente, dado que la antigenicidad de las secciones de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo y es posible que se dañen debido a los factores ambientales si se almacenan durante un periodo prolongado.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y especificidad del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos normales. Los resultados de la tinción se muestran en la Tabla 6. La sensibilidad y especificidad del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) también se determinó mediante un estudio que presentaba tinción de membrana no específica en la mayor parte de los tejidos neoplásicos. Los resultados de la tinción se muestran en la

Tabla 7. La tinción para comprobar la sensibilidad y la especificidad se llevó a cabo con el protocolo /VIEW DAB Detection Kit en un instrumento BenchMark XT o con el protocolo *ultraView* en el caso del instrumento BenchMark ULTRA que se han mencionado anteriormente.

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

La sensibilidad depende de la conservación del antígeno. El manejo incorrecto del tejido durante el fijado, el corte, la inclusión o el almacenamiento que modifica la antigenicidad, debilita la capacidad de detección de la proteína HER2 que tiene el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Tabla 6. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

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

^a Tinción focal de la superficie de células epiteliales

^b Tinción membranosa de células superficiales en paraguas

^c Tinción focal de membrana

Tabla 7. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/2
Meningioma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebro)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/2

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma, sin especificar (ovario)	1/2
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	0/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Carcinoma, sin especificar (páncreas)	0/3
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma, sin especificar (tiroides)	0/3
Carcinoma ductal microinvasivo (mama)	2/2
Carcinoma ductal invasivo (mama)	42/99
Carcinoma, sin especificar (mama)	1/4
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma, sin especificar (pulmón)	0/2
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/4
Adenocarcinoma (estómago)	8/88
Carcinoma de células en anillo de sello (Estómago)	0/4
Carcinoma, sin especificar (estómago)	0/3
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
Tumor estromal gastrointestinal (intestino delgado)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/32
Tumor estromal gastrointestinal (colon)	0/1
Carcinoma, sin especificar (colon)	1/3
Adenocarcinoma (recto)	1/5
Tumor estromal gastrointestinal (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/3
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma, sin especificar (hígado)	0/3
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Carcinoma, sin especificar (riñón)	0/5
Adenocarcinoma (próstata)	0/2
Carcinoma, sin especificar (próstata)	0/3

Patología	N.º de casos positivos/total
Leiomioma (útero)	0/1
Adenocarcinoma (útero)	0/1
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/2
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1
Neurofibroma (lumbar)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Mesotelio (peritoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma polimorfo (peritoneo)	0/1
Linfoma, sin especificar	0/3
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (bazo)	0/1
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	1/1
Leiomiomasarcoma (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomiomasarcoma (músculo liso)	0/1
Adenocarcinoma rectal (metastásico)	0/1
Adenocarcinoma de colon (metastásico)	0/7
Adenocarcinoma mucinoso de colon (metastásico)	0/1
Neoplasia neuroendocrina, sin especificar	0/2
Leiomioma	0/2
Melanoma	0/2
Sarcoma, sin especificar	0/2
Carcinoma no diferenciado, sin especificar	0/1

Repetibilidad y reproducibilidad

Estudios de repetibilidad y precisión intermedia

La reproducibilidad en una sola sesión de la tinción del instrumento BenchMark XT se determinó mediante la tinción de tres portaobjetos, cada uno con cinco tejidos de cáncer de mama cuyas puntuaciones de la expresión de HER-2 eran 0, 1+, 2+ y 3+. En cada uno de los casos, tres de los tres portaobjetos se tiñeron adecuadamente en una sola sesión y en todos los instrumentos de la prueba. Los usuarios deben comprobar los resultados de reproducibilidad en una sesión mediante la tinción de varios conjuntos de secciones en serie con una densidad del antígeno baja, media y alta en una sola sesión.

La reproducibilidad entre sesiones y entre plataformas de la tinción se determinó mediante la tinción de tres portaobjetos, cada uno con cinco tejidos de cáncer de mama, cuyas puntuaciones de la expresión de HER-2 eran 0, 1+, 2+ y 3+ en tres sesiones diferentes en el instrumento BenchMark XT. En cada uno de los casos, nueve de los nueve portaobjetos se tiñeron adecuadamente en las tres sesiones y en todos los instrumentos de la prueba. Los usuarios deben comprobar los resultados de

reproducibilidad entre sesiones mediante la tinción de varios conjuntos de secciones en serie con una densidad del antígeno baja, media y alta en diferentes días.

Reproducibilidad entre lotes

La reproducibilidad entre lotes se determinó mediante una tinción automatizada de 5 tejidos de cáncer de mama cuyas puntuaciones de la expresión de HER2 eran 0, 1+, 2+ y 3+ con tres lotes del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5). Tres lectores cualificados asignaron una puntuación a los tejidos con tinción con una escala de 0 a 3+. Hubo una concordancia del 100 % entre los lotes y entre los lectores de los tres portaobjetos y los cinco tejidos con tinción.

Estudios de reproducibilidad entre laboratorios y entre lectores en un instrumento BenchMark XT

Reproducibilidad de las puntuaciones entre laboratorios y entre lectores de la tinción con el instrumento BenchMark XT: Tres laboratorios, pertenecientes a instituciones diferentes de EE. UU., participaron en el estudio de reproducibilidad entre laboratorios. Se enviaron los portaobjetos con secciones de 40 casos de carcinoma de mama invasivo fijados con formol tamponado neutro [10 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] y seis (6) PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides a cada uno de los centros para llevar a cabo la tinción con un instrumento BenchMark XT junto con el protocolo de tinción recomendado. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada caso teñido con el reactivo Ig negativo. Ninguno de los centros se encontró con sesiones no válidas según el rendimiento de los controles. Los resultados se analizaron en Ventana. De los 40 portaobjetos, 34 presentaron intensidades de tinción parecidas en todos los centros de tinción. Seis de las muestras (6/40 o el 15 %) contenían una variación no superior a un nivel de intensidad. Tres de las muestras (3/6) contenían una variación entre 0 y 1+, en cuyo caso ambas se considerarían negativas. Dos de las muestras (2/40 o el 5 %) contenían una variación entre 2+ y 3+ y una sola muestra (1/40), una variación entre 1+ y 2+. En los 40 casos (100 %) un mínimo de 2 de los 3 anatomopatólogos estaban de acuerdo.

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

Reproducibilidad entre laboratorios y entre días de la tinción con el instrumento BenchMark ULTRA

Tres laboratorios, pertenecientes a instituciones diferentes de EE. UU., participaron en el estudio de reproducibilidad entre laboratorios. Se distribuyeron portaobjetos con secciones de 48 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [12 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)] y un par de PATHWAY HER-24 in 1 Control Slides en cada una de las 12 sesiones de tinción para estudiar la tinción en los centros con un instrumento BenchMark ULTRA y el protocolo de tinción recomendado, junto con ultraView Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada caso teñido con el reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Los resultados se analizaron en Ventana. Con la nomenclatura estándar para las tablas de 2x2, el promedio de concordancia positiva (APA) en todos los sitios se calculó a través de la fórmula $[2a/(2a+b+c)]$ y el promedio de concordancia negativa (ANA) se calculó a través de la fórmula $[2d/(2d+b+c)]$. En todos los sitios, el APA entre sitios, con base en la evaluación clínica (positivo/negativo), fue del 90.0 % (108/120) y el ANA fue del 92.9 % (156/168). En las comparaciones entre pares de los sitios, se calculó el APA mediante $a/(a+c)$ y el ANA mediante $d/(b+d)$. Los porcentajes de APA entre sitios fueron del 93.0 % (40/43), del 87.2 % (34/39) y del 89.5 % (34/38) entre el sitio A y el sitio B, entre el sitio A y el sitio C y entre el sitio B y el sitio C, respectivamente. Los porcentajes de ANA entre sitios fueron del 94.3 % (50/53), del 91.2 % (52/57) y del 93.1 % (54/58) entre el sitio A y el sitio B, entre el sitio A y el sitio C y entre el sitio B y el sitio C, respectivamente.

Las tablas Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10 que aparecen a continuación son presentaciones de 3x3 de los resultados de cada lector con base en la puntuación clínica, en la que se separaron 2+ y 3+:

Tabla 8. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el sitio A y el sitio B: anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA con ultraView Universal DAB Detection Kit.

Sitio A	Sitio B			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	12	2	0	14
2+	0	6	2	8

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

Tabla 9. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el centro A y el centro C: anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

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

Tabla 10. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre laboratorios entre el centro B y el centro C: anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA con *ultraView* Universal DAB Detection Kit.

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

Reproducibilidad entre días de la tinción con el instrumento BenchMark ULTRA

En la parte del estudio correspondiente a la reproducibilidad entre días (IDR) se incluyeron 12 casos con una distribución prevista de aproximadamente tres (3) casos de cada puntuación clínica (0, 1+, 2+ y 3+). En total se llevó a cabo la parte del estudio correspondiente a la IDR mediante cinco sesiones en un instrumento BenchMark ULTRA en un solo centro (Sitio C) y en un periodo mínimo de 20 días, de forma que las tinciones no se realizaran en dos días consecutivos. Los porcentajes de APA y ANA de la IDR, con base en la evaluación clínica de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el sitio C en todos los días, fue en ambos casos del 100 %. Los índices de los índices de concordancia global (OPA) de las comparaciones entre días, con base en las puntuaciones clínicas, fueron del 100 % en cada una de las comparaciones entre días y en la combinación de todos los días.

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

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

reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Los resultados se analizaron en Ventana.

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

En las tablas 11-14 se encuentran las presentaciones de estos resultados.

Tabla 11. Concordancia combinada del estado HER2 con el estado modal a nivel de caso de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

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

Tabla 12. Índice de concordancia combinada del sitio de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

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

Farm. ROCHETA MILANOZZA
 PRODUCI. ROCHÉ S.A. e. l.
 Divisione Diagnostica
 DT & APODERAZIONE LEGAL

Estado HER2 del Sitio i	Estado HER2 del Sitio j		Total
	Positiva	Negativa	
Porcentaje de concordancia global	8054/8400	95.9 (92.7, 98.6)	

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

Tabla 13. Índices de concordancia combinada entre lectores de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

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

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

Tabla 14. Índices de concordancia combinada entre días de las comparaciones entre pares del estado HER2 de los casos de carcinoma de mama teñidos con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

Estado HER2 del Día i	Estado HER2 del Día j		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	817	15	832
Negativa	35	813	848
Total	852	828	1680
	n/N	% (CI del 95 %)	
Promedio de concordancia positiva	1634/1684	97.0 (95.0, 98.9)	
Promedio de concordancia negativa	1626/1676	97.0 (94.8, 98.9)	
Porcentaje de concordancia global	1630/1680	97.0 (95.0, 98.9)	

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

Estudio de comparación entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT

Dos laboratorios de tinción únicos y tres sitios de lectura de EE. UU. participaron en el estudio de comparación de plataformas. Se distribuyeron aleatoriamente portaobjetos con secciones de 280 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [aproximadamente 70 unidades de cada una de las categorías de agrupamiento HER2 (0, 1+, 2+, 3+)] a dos centros de tinción (140 casos a cada sitio) para que se llevara a cabo la tinción con los

instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA con el protocolo de tinción recomendado y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles figuraban PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides y un segundo portaobjetos de cada caso teñido con el reactivo Ig negativo. Los casos con tinción del Sitio 1 y el Sitio 2 se dividieron en cuatro conjuntos de portaobjetos que se facilitaron, de uno en uno, a los tres lectores cualificados (anatomopatólogos), un lector en el Sitio 1, otro en el Sitio 2, y el último, en el Sitio 3. Tanto los estados de los casos como la plataforma de tinción estaban enmascarados y los anatomopatólogos evaluaron en estas condiciones los cuatro conjuntos de portaobjetos y proporcionaron una puntuación clínica en cada caso (0, 1+, 2+, 3+). Los resultados se analizaron en Ventana. Los porcentajes de PPA (y el límite inferior de los intervalos de confianza del 95 % bilaterales) de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basados en la evaluación clínica positiva frente a la negativa, fueron del 91.6 % (85.9), 91.2 % (85.3) y del 94.9 % (89.3) en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. Los porcentajes de NPA (y el límite inferior de los intervalos de confianza del 95 % bilaterales) de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basados en la evaluación clínica positiva frente a la negativa, fueron del 91.9 % (85.8), 93.8 % (88.3) y del 99.3 % (96.3) en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. El OPA del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) con el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT, basado en un análisis 2x2 de la evaluación clínica positiva frente a la negativa, fue de 91.8 %, 92.5 % y de 97.4 % en el caso del Lector A, B y C, respectivamente. En las tablas Tabla 15, Tabla 16 y Tabla 17 se muestran la presentación 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas de cada lector, con base en las puntuaciones clínicas (0/1+, 2+, 3+).

Tabla 15. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector A.

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

Tabla 16. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector B.

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

Tabla 17. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre plataformas del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT: Lector C.

Instrumento BenchMark ULTRA	Instrumento BenchMark XT			
	Lector C	3+	2+	0, 1+
3+	64	1	0	65

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

Estudio de comparación entre los instrumentos BenchMark ULTRA PLUS y BenchMark ULTRA

Tres laboratorios de diferentes instituciones de Estado Unidos participaron en un estudio de concordancia entre el instrumento BenchMark ULTRA PLUS y el instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron en Ventana portaobjetos con secciones de 122 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE de cada una de las categorías de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+) con el instrumento BenchMark ULTRA y el protocolo de tinción recomendado, junto a *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles se encontraban un portaobjetos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide y un tejido de control positivo de carcinoma de mama por sesión de tinción. Además, se tiñó un segundo portaobjetos de cada caso de prueba con un reactivo Ig negativo. Los portaobjetos con secciones de los mismos casos se aleatorizaron y se distribuyeron de forma equitativa (40-41 casos por sitio) en los sitios del estudio para su tinción en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS con el protocolo de tinción recomendado y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. Entre los controles se encontraban un portaobjetos PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slide y un tejido de control positivo de carcinoma de mama por sesión de tinción. Además, se tiñó un segundo portaobjetos de cada caso de prueba con un reactivo Ig negativo. Los anatomopatólogos, con los estados de casos enmascarados, evaluaron los portaobjetos teñidos en un instrumento BenchMark IHC/ISH y facilitaron una puntuación clínica (como 0, 1+, 2+ y 3+). Tras un periodo de reposo de dos semanas, los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos teñidos en el segundo instrumento BenchMark IHC/ISH. Los resultados se analizaron en Ventana. Una puntuación HER2 de IHC de 0+ o de 1+ se consideraba negativa y una puntuación HER2 de IHC de 2+ o de 3+ se consideraba positiva. Los porcentajes de OPA, PPA y NPA fueron del 91.0% (333/366), del 93.3% (154/165) y del 89.1% (179/201) respectivamente. Los intervalos de confianza (CI) bilaterales del 95 % se calcularon mediante el método bootstrap percentil. Los índices de aceptabilidad de fondo y morfología de todos los casos fueron del 100 % en ambos instrumentos. En la tabla 18 se encuentran las presentaciones de estos resultados.

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

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

Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras del estudio de comparación de plataformas

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

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

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

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

Para llevar a cabo el estudio comparativo entre el *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit de las tinciones con anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) con un instrumento BenchMark ULTRA, se utilizó en el Centro 1 una cohorte de 140 casos de carcinoma de mama invasivo FFPE [aproximadamente 35 casos de cada categoría de agrupamiento HER-2 (0, 1+, 2+, 3+)]. Un laboratorio de tinción único y tres centros de lectura de EE. UU. participaron en el estudio de comparación de la detección. En el caso de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en el instrumento BenchMark ULTRA, los porcentajes de PPA entre los resultados obtenidos mediante los métodos *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit, con base en la evaluación clínica (positiva, negativa), fueron del 95.8 % (68/71), del 96.9 % (63/65) y del 96.5 % (55/57) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente, y los porcentajes de NPA entre los métodos de detección fueron del 90.8 % (59/65), del 91.5 % (65/71) y del 97.5 % (77/79) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente. Los porcentajes de OPA entre los kits de detección fueron del 93.4 % (127/136), 94.1 % (128/136) y del 97.1 % (132/136) en el caso de los lectores A, B y C, respectivamente. En las tablas Tabla 19, Tabla 20 y Tabla 21 se muestran las presentaciones 3x3 de los índices de concordancia de la comparación de la detección de cada lector, con base en las puntuaciones clínicas (0/1+, 2+, 3+).

Tabla 19. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit del Lector A: tinción con el anticuerpo PATHWAY HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA.

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

Farm. ROBERTA M. LE MOZZA
PROFESIONIS ROCHÉ S.A. G. e. I.
DIVISION DIAGNOSTICA
DT & APODIARCA LEGAL

Tabla 20. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre MIEW DAB Detection Kit y ultraView Universal DAB Detection Kit del Lector B: tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA.

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

Tabla 21. Análisis 3x3 de los índices de concordancia entre MIEW DAB Detection Kit y ultraView Universal DAB Detection Kit del Lector C: tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) en un instrumento BenchMark ULTRA.

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

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

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

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

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

RENDIMIENTO CLÍNICO

Estudios comparativos entre el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) y PATHWAY anti-HER2 (CB11) Mouse Monoclonal Antibody

Se llevó a cabo un estudio comparativo del método para evaluar la relación de los resultados entre el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) y el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) con PathVysion HER2 FISH, siendo ambos pruebas diagnósticas

homologadas previamente por la FDA. En el estudio participaron seis investigadores. Dos conjuntos de tres investigadores diferentes evaluaron dos cohortes independientes (Cohorte 1: n = 144, Cohorte 2: n = 178) mediante casos conocidos de cáncer de mama teñidos con HER2 CB11 y HER2 4B5. Los datos de FISH se obtuvieron de la historia clínica del paciente. Se creó una puntuación de consenso entre los tres lectores en cada anticuerpo para evitar la conocida variabilidad del lector que se produce en la puntuación de HER2.^{27,28,29} Se evaluaron un total de 322 casos. Los portaobjetos con tinción del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (CB11) se procesaron y se teñieron según las instrucciones del fabricante que se especificaban en la hoja de datos del anticuerpo CB11. Había transcurrido un periodo medio de aproximadamente un año entre la tinción y la lectura de los portaobjetos con tinción CB11. Dado que las puntuaciones de uno de los seis lectores se encontraban fuera del intervalo de confianza, los datos de las dos cohortes se presentan a continuación.

Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras de los estudios de comparación

Tabla 22. Cohorte 1: puntuaciones consensuadas de IHC de tres anatomopatólogos.

Puntuación 4B5	Puntuación CB11			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	29	24	5	58
2+	2	13	17	32
0, 1+	0	0	53	53
Total	31	37	75	143
Cohorte 1: Características de rendimiento en la presentación 3x3. Concordancia global: (29+13+53)/143 = 66.4 % (CI del 95 % = 38.6 %, 59.7 %). Cohorte 1: Características de rendimiento en la presentación 2x2 (las puntuaciones positivas (2+ y 3+) y negativas (0+ y 1+) del anticuerpo HER2 se presentan combinadas).				
<ul style="list-style-type: none"> Porcentaje de concordancia positiva: (29+2+24+13)/(31+37) = 100 % (% de CI del 95 % = 97.5 %-100 %). Porcentaje de concordancia negativa: 53/75 = 70.7 % (CI del 95 % = 58.5 %-80.1 %). Concordancia global: (29+24+2+13+53)/143 = 84.7 % (CI del 95 % = 78.2 %-90.0 %). 				

Tabla 23. Cohorte 2: puntuaciones consensuadas de IHC de tres anatomopatólogos.

Puntuación 4B5	Puntuación CB11			Total
	3+	2+	0, 1+	
3+	72	1	0	73
2+	1	12	5	18
0, 1+	0	7	80	87
Total	73	20	85	178
Cohorte 2: Características de rendimiento en la presentación 3x3. Concordancia global: (72+12+80)/178 = 92.1 % (CI del 95 % = 80.1 %, 93.1 %). Cohorte 2: Características de rendimiento en la presentación 2x2 (las puntuaciones positivas (2+ y 3+) y negativas (0+ y 1+) del anticuerpo HER2 se presentan combinadas).				
<ul style="list-style-type: none"> Porcentaje de concordancia positiva: (72+12+1+1)/(73+20) = 92.5 % (CI del 95 % = 85.2 %-96.9 %). Porcentaje de concordancia negativa: 80/85 = 94.1 % (CI del 95 % = 86.8 %-98.1 %). Concordancia global: (72+12+1+1+80)/178 = 93.3 % (CI del 95 % = 88.5 %-96.4 %). 				

Farm. ROBERTA H. LE. MOZZA
 PRODUCTOS ROCHÉ S.A. de C.V.
 División Diagnóstica
 DT & APODERADO LEGAL

Tabla 24. Cohorte 1: puntuaciones consensuadas de IHC CB11 de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación CB11	Resultado FISH		Total
	Positiva	Negativa	
3+	32	0	32
2+	32	5	37
0, 1+	22	53	75
Total	86	58	144

Cohorte 1: Características de rendimiento de CB11 y FISH en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva (32+32)/86 = 74.4 % (CI del 95 % = 63.8 %-83.2 %).
- Porcentaje de concordancia negativa: 53/58 = 91.4 % (CI del 95 % = 80.9 %-97.1 %).
- Concordancia global: (32+32+53)/144 = 81.2 % (CI del 95 % = 73.9 %-87.2 %).

Tabla 27. Cohorte 2: puntuaciones consensuadas de IHC 4B5 de tres anatomopatólogos: comparación con FISH.

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

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

- Porcentaje de concordancia positiva (72+11)/93 = 89.2 % (CI del 95 % = 82.5 %-95.1 %)
- Porcentaje de concordancia negativa: 77/85 = 90.6 % (CI del 95 % = 84.0 %-96.4 %)
- Concordancia global: (72+11+77)/178 = 90.0 % (CI del 95 % = 85.4 %-93.6 %)

Tabla 25. Cohorte 1: puntuaciones consensuadas de IHC 4B5 de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

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

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

- Porcentaje de concordancia positiva (55+25)/86 = 93.0 % (CI del 95 % = 87.9 %-96.3 %).
- Porcentaje de concordancia negativa: 47/58 = 81.0 % (CI del 95 % = 73.4 %-86.0 %).
- Concordancia global: (55+25+47)/144 = 88.2 % (CI del 95 % = 82.1 %-92.2 %).

Reproducibilidad entre anatomopatólogos de las muestras de los estudios de comparación

Dado que es un hecho que los diferentes anatomopatólogos pueden llevar a cabo distintas interpretaciones de los portaobjetos de IHC, tres anatomopatólogos analizaron cada una de las dos cohortes (un total de 6 anatomopatólogos) para proceder a la lectura de todas las muestras. Se adjudicaron los resultados definitivos mediante una regla de dos de tres. A continuación se expone un resumen de los resultados variables que se obtuvieron por parte de los tres anatomopatólogos en cuanto a las muestras del estudio comparativo de cada cohorte (Cohorte 1: n = 178, Cohorte 2: n = 144).

Tabla 28. Cohorte 1: Puntuación 4B5 de los tres anatomopatólogos.

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

Tabla 26. Cohorte 2: puntuaciones consensuadas de IHC CB11 de tres anatomopatólogos en comparación con FISH.

Puntuación CB11	Resultado FISH		Total
	Positiva	Negativa	
3+	72	1	73
2+	13	7	20
0, 1+	8	77	85
Total	93	85	178

Cohorte 2: Características de rendimiento de CB11 y FISH en presentación de 2x2 (en la que las puntuaciones de 2 y 3 se consideran positivas).

- Porcentaje de concordancia positiva (72+13)/93 = 91.3 % (CI del 95 % = 85.0 %-96.7 %).
- Porcentaje de concordancia negativa: 77/85 = 90.6 % (CI del 95 % = 83.9 %-96.3 %).
- Concordancia global: (72+13+77)/178 = 91.0 % (CI del 95 % = 86.5 %-94.9 %).

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

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

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

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

Farm. RODRIGUEZ HERRERA
 PRODUCTOS ROCHES S.A. de C.V.
 División Diagnóstico
 DT & APODERADA LEGAL

Tabla 29. Cohorte 1: Puntuación CB11 de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación CB11		
	Investigador 1	Investigador 2	Investigador 3
3+	72	75	73
2+	22	22	18
0,1+	80	81	87
Total	174	178	178

Nota: Según la evaluación de tres anatomopatólogos, en un total de una muestra existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 1-3+).
Muestra 1: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 1+, el segundo asignó 2+ y el tercero, 3+.

Tabla 30. Cohorte 2: Puntuación 4B5 de los tres anatomopatólogos.

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

Nota: Según la evaluación de tres anatomopatólogos, en un total de seis muestras existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 0, 3+).
Muestra 1: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 0+ y el tercero, 2+.
Muestra 2: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 1+, el segundo asignó 1+ y el tercero, 3+.
Muestra 3: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 2+ y el tercer anatomopatólogo asignó 2+.
Muestras 4 y 5: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 2+ y el tercero, 2+.
Muestra 6: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 3+ y el tercero, 3+.

Tabla 31. Cohorte 2: Puntuación CB11 de los tres anatomopatólogos.

Puntuación HER2	Puntuación CB11		
	Investigador 4	Investigador 5	Investigador 6
3+	31	37	28
2+	38	32	47
0,1+	75	75	69
Total	144	144	144

Nota: Según la evaluación de tres anatomopatólogos, en un total de ocho muestras existía una variación en más de un nivel de graduación (por ejemplo, 0-2+).
Muestras 1-6: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 1+ y el tercero, 2+.
Muestras 7 y 8: Un anatomopatólogo asignó la puntuación 0+, el segundo asignó 2+ y el tercero, 2+.

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

Tabla 32. Rangos en 2x2* de la concordancia de los tres anatomopatólogos.

	Porcentaje de concordancia global	Porcentaje de concordancia positiva	Porcentaje de concordancia negativa
4B5 frente a CB11			
Cohorte 1	82.6-86.9 %	97.3-100.0 %	68.0 %-75.4 %
Cohorte 2	88.2-95.5 %	87.6-95.6 %	86.1-95.4 %
4B5 frente a FISH			
Cohorte 1	86.8-88.2 %	90.7-94.2 %	79.3-81.0 %
Cohorte 2	87.4-89.9 %	88.2-90.0 %	84.5-91.8 %
CB11 frente a FISH			
Cohorte 1	79.9-84.0 %	73.3-80.2 %	89.7-89.7 %
Cohorte 2	84.8 %-93.3 %	86.7-92.5 %	82.7-94.1 %

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

Estudio de los resultados clínicos: KATHERINE

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

Las muestras de las pacientes se tiñeron con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) y con el ensayo INFORM HER2 Dual ISH y se evaluaron la aceptabilidad de la tinción y el estado de HER2. En general, la mayoría de las muestras consistían en biopsias previas al tratamiento (80.9 %), extraídas principalmente como biopsias (75.3 %) o a través de métodos quirúrgicos (24.3 %). La mayor parte de las muestras presentaban subtipo neoplásico ductal (95.4 %) y la mayoría no se habían obtenido de una muestra metastásica (96.2 %).

En la Tabla 33 se encuentra la descripción del índice global de aceptabilidad de la tinción del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) entre la población con intención de diagnosticar (ITD) a nivel de paciente. En la población ITD PATHWAY ITD Population, de un total de 1788 pacientes, 55 se consideraron no aptos en el intento inicial de tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5). Durante la repetición de la tinción de estos pacientes, se llevó a cabo una tinción adecuada de todas las muestras, salvo cuatro. Los índices globales de aceptabilidad de la tinción inicial y final del anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) fueron del 96.9 % y del 99.8 %, respectivamente. Los índices de aceptabilidad de la tinción de fondo y de aceptabilidad de la morfología de los portaobjetos con tinción de anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) también se incluyeron en el informe. Los índices globales de aceptabilidad de la tinción de fondo inicial y final de la población ITD (ITD Population) fueron del 99.6 % y del 99.9 %, respectivamente. Los índices de aceptabilidad de la morfología inicial y final fueron del 99.2 % y del 99.9 %, respectivamente.

Tabla 33. Características de rendimiento de la tinción con el anticuerpo PATHWAY anti-HER2 (4B5).

Atributos	Índice de porcentaje de aceptabilidad (n/N) (CI del 95 %)	
	Inicial*	Final**
Índice global de aceptabilidad de la tinción	96.9 (1733/1788) (96.0, 97.6)	99.8 (1784/1788) (99.4, 99.9)
Fondo	99.6 (1768/1775) (99.2, 99.8)	99.9 (1786/1787) (99.7, 100.0)

Farm. ROBERTA WILE MOZZA
 PRODUCTOS ROCHE S.A. de I.
 División Diagnóstico
 DT & APODERADA LEGAL

Atributos	Índice de porcentaje de aceptabilidad (n/N) (CI del 95 %)	
	Inicial*	Final**
Morfología	99.2 (1762/1776) (98.7, 99.5)	99.9 (1787/1788) (99.7, 100.0)

* El intento de la tinción inicial es el primer intento de tinción del paciente

** El intento final de tinción es el intento de tinción que se ha utilizado en la decisión de la incorporación al estudio BO27938

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

Se administró KADCYLA por vía intravenosa en dosis de 3.6 mg/kg en el primer día de un ciclo de 21 días. Se administró trastuzumab por vía intravenosa en dosis de 6 mg/kg en el primer día de un ciclo de 21 días. Se trató a los pacientes con KADCYLA o trastuzumab durante un total de 14 ciclos a menos que surgiera una recidiva de la enfermedad, una revocación del consentimiento o una toxicidad inaceptable, lo que sucediera en primer lugar. En el momento del análisis principal, la mediana de la duración del tratamiento era de 10 meses (rango: 1-12) en el caso de KADCYLA y de 10 meses (rango: 1-13) en el caso de trastuzumab. Los pacientes que dejaron de recibir la administración de KADCYLA pudieron finalizar la duración del tratamiento del estudio previsto con hasta 14 ciclos de tratamiento dirigido contra HER2 con trastuzumab si se consideraba adecuada, en base a las consideraciones de toxicidad y a la discreción del investigador.

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

Los datos demográficos de los pacientes y las características iniciales del tumor estaban bien equilibrados entre los brazos del estudio. La edad media era de aproximadamente 49 años (rango de entre 23 y 80 años), un 72.8 % eran pacientes blancos, el 8.7 % eran asiáticos y el 2.7 % eran de raza negra o afroamericana. Todos los pacientes, salvo 5, eran mujeres. El 22.5 por ciento de los pacientes se incorporaron al estudio en Norteamérica, el 54.2 % en Europa y el 23.3 % procedían del resto del mundo. Entre las características pronósticas del tumor figuraban el estado del receptor hormonal (positivo: 72.3 %, negativo: 27.7 %), la fase clínica durante la presentación (inoperable: 25.3 %, operable: 74.8 %) y el estado nodal patológico tras el tratamiento preoperatorio (nodo positivo: 46.4 %, nodo negativo sin evaluar: 53.6 %) y eran parecidas en todos los brazos del estudio.

A la mayor parte de los pacientes (76.9 %) se les había administrado el régimen de quimioterapia neoadyuvante con contenido de antraciclina. Al 19.5 % se le había administrado otro agente dirigido contra HER2 además de trastuzumab como un componente del tratamiento neoadyuvante. Pertuzumab había sido el segundo tratamiento administrado al 93.8 % de los pacientes, que habían recibido un segundo agente neoadyuvante dirigido contra HER2.

Se observó una mejoría clínica y estadísticamente significativa en la IDFS en los pacientes cuyas muestras de cáncer de mama se identificaron como positivas en HER2 con el ensayo PATHWAY anti-HER2 (4B5), que recibieron trastuzumab emtansina (KADCYLA) en comparación con trastuzumab (Herceptin) (HR = 0.43, CI del 95 % [0.32, 0.58]), lo que corresponde a una reducción del 57 % del riesgo de un evento de IDFS. Los resultados de eficacia en el subgrupo positivo mediante IHC se muestran en la Tabla 34 y en la Figura 2.

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

Tabla 34. Resultados de eficacia de KATHERINE en el subgrupo positivo mediante IHC.

	KADCYLA N.º = 573	Trastuzumab N.º = 559
<i>Criterio de valoración primario</i>	Supervivencia sin cáncer invasivo (IDFS) ¹	
Número (%) de pacientes con evento	64 (11.2 %)	130 (23.3 %)
HR [CI del 95 %]	0.43 [0.32, 0.58]	
Índice en porcentaje (%) de casos sin eventos en 3 años ²	89.0	75.7

1. Datos recogidos del primer análisis provisional

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

Los datos del estudio KATHERINE indican que el tratamiento adyuvante con trastuzumab emtansina (KADCYLA) demostró ser claramente beneficioso en comparación con el tratamiento con trastuzumab (Herceptin) en pacientes con cáncer de mama en etapa temprana positivos a HER2 y enfermedad residual tras la finalización de un tratamiento neoadyuvante. Los ensayos PATHWAY anti-HER2 (4B5) y INFORM HER2 Dual ISH resultan útiles a la hora de identificar a aquellos pacientes que tienen más probabilidades de mejorar con el tratamiento de trastuzumab emtansina (KADCYLA).

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de la sesión de control positivo que se han analizado en la misma sesión y el mismo instrumento para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
- Si el control positivo es negativo, debe asegurarse de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si se ha etiquetado correctamente el portaobjetos, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado en la misma sesión y el mismo instrumento para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, la conservación y la fijación.
- Si no se ha eliminado toda la parafina, es posible que no se presente la tinción. El procedimiento de desparafinado debería repetirse.
- Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, se debe repetir la sesión reduciendo el tiempo de incubación en intervalos de 4 minutos para obtener la intensidad de tinción deseada.
- Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, debe comprobar que los portaobjetos tienen carga positiva.
- Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento paso a paso, el Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

Farm. ROBERTA MILLEMOZZA
PRODUCIOS ROCHE S.A. de I.
Division Diagnostica
DT & APODERADO LEGAL

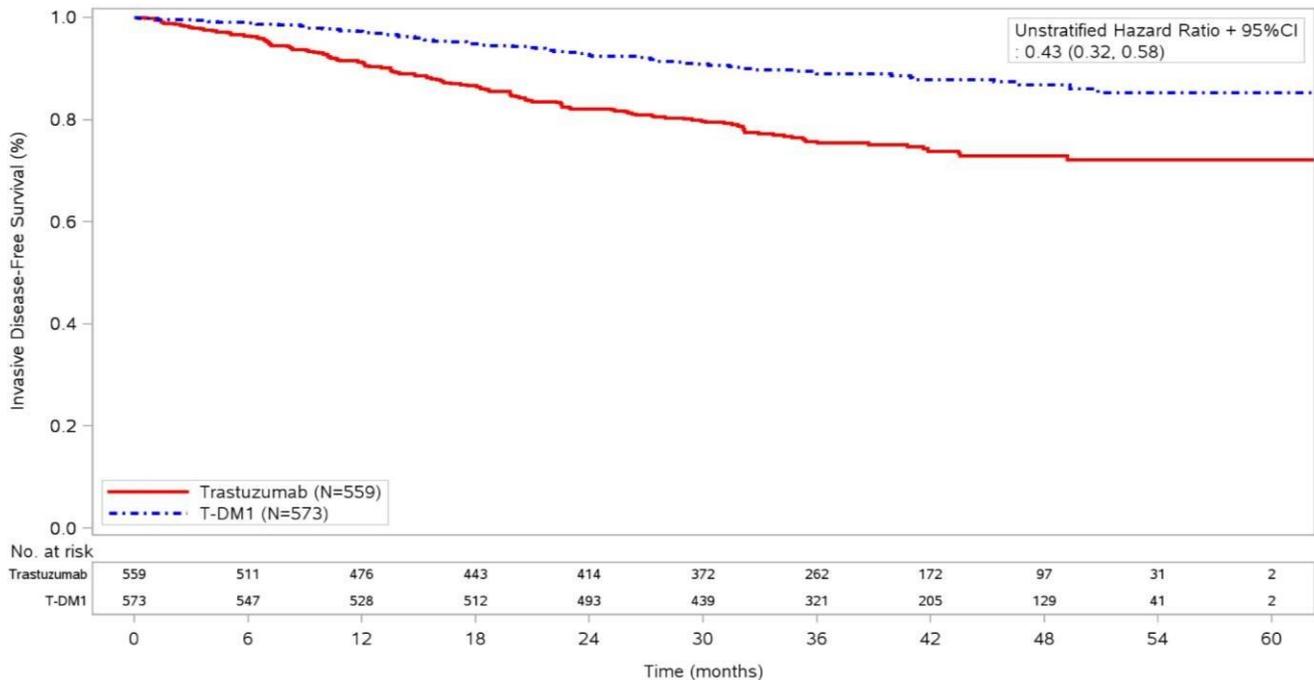


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia sin cáncer invasivo en KATHERINE. (T-DM1: trastuzumab emtansina (KADCYLA))

REFERENCIAS

- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*. 1986;232:1644-1646.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumour cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J*. 1987;6:605-610.
- Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egfr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
- Dickson RB, and Lippman ME. *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Keatings L, Sinclair J, Wright C, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*. 1990;17:234-247.
- 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.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses Her2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-628.
- DePoter CR, Van Daele S, Van De Vijver MJ, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. *Histopathology*. 1989;15:351-362.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- 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.
- Herman GE, Elfant EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem*. 1991;66:194-199.
- Omata M, Liew CT, Ashcava M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*. 1980;73:626-32.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med*. 1983;14:767.

27. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2001;14:1079-86.
28. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. *J Clin Pathol.* 1994;47:816-22.
29. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol.* 2003;16:173-182.

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

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

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

SÍMBOLOS

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



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



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

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA M.F.L. MAZZA
PRODUCES ROCHE S.p.A. e.s.
Division Diagnostica
DT & APODERADA LEGAL

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4286

05278384001

IVD  50

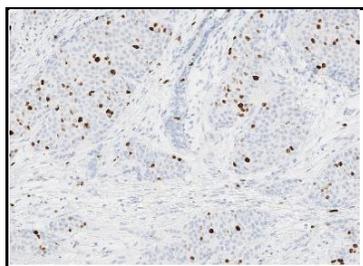


Figura 1. Tinción del carcinoma de mama con el anticuerpo CONFIRM anti-Ki67 (30-9)

USO PREVISTO

El anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina teñido con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica

pertinente y los controles adecuados.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9)) detecta el marcador de proliferación Ki-67 (MKI67), más conocido como Ki-67.

Ki-67 es una proteína nuclear cuya expresión se observa en células proliferativas. Ki-67 codifica dos isoformas de la proteína con pesos moleculares de entre 345 y 395 kDa.

¹ Ki-67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M) y ausente en las células en reposo (G0). ¹ La expresión de Ki-67 varía durante las fases activas del ciclo celular, comenzando en la fase G1 e incrementándose durante la fase S y llegando a los niveles más altos en la metafase. ² Durante la anafase y la telofase, la expresión de Ki-67 comienza a reducirse. ² No se ha definido por completo la función de Ki-67 y apenas se conocen más detalles, salvo que es una proteína fosforilada a través de la serina y la treonina que desempeña un papel fundamental en la división celular. ³ La ausencia de la proteína Ki-67 en las células en reposo y su expresión en todas las células proliferativas, ya sean tejidos normales o neoplásicos, hace que el anticuerpo Ki-67 sea muy útil en la determinación de la fracción de crecimiento de cualquier población celular humana determinada. ¹

La detección de la proteína Ki-67 mediante inmunohistoquímica (IHC) con el anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) puede servir de ayuda en la identificación de la proliferación celular en tejidos normales o neoplásicos. Se puede utilizar como parte de un panel de estudios de IHC. El patrón de tinción es nuclear.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) puede usarse como el anticuerpo primario para la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido con parafina. En general, la tinción inmunohistoquímica permite la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) que se une al antígeno, de un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) que se une al anticuerpo primario, de un complejo enzimático y de un sustrato cromogénico en pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio donde se encuentra el antígeno. A partir de ahí se puede llevar a cabo una contratinción de la muestra y añadir un cubreobjetos. Los resultados se interpretan mediante microscopía óptica y contribuyen al diagnóstico diferencial de los procesos patofisiológicos que pueden estar asociados con un antígeno concreto o no.

La dilución del anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) es óptima para su uso con *ultraView* Universal DAB, con los kits de detección *OptiView* DAB IHC y con los instrumentos *BenchMark* IHC/ISH. Para obtener información más detallada sobre el funcionamiento del instrumento, consulte el Manual del usuario del instrumento correspondiente.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) contiene aproximadamente 10 µg de un anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra la proteína Ki-67 que se encuentra presente en el tejido.

El anticuerpo se diluye en un tampón formado por Tris-HCl con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.10 % un conservante.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 2 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) es un anticuerpo monoclonal de conejo producido como sobrenadante de cultivo celular.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n.º cat. 790-4795 / 06683380001)
4. *OptiView* DAB IHC Detection Kit (n.º cat. 760-700 / 06396500001)
5. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Medio de montaje
15. Cubreobjetos de cristal
16. Equipo de laboratorio de uso general
17. Instrumento *BenchMark* IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos fijados con formol y embebidos en parafina (FFPE) que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos *BenchMark* IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %. ⁴ Las secciones de tejido se deben cortar con un grosor aproximado de 4 µm y colocarse en portaobjetos cargados positivamente. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
6. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
7. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{5,6}
8. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
9. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
10. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en dialog.roche.com.
11. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
12. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
13. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Normativa (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
	P273	Evitar su emisión al medio ambiente.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, masa reactiva de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

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

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 790-4286.

Tabla 2. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) con OptiView DAB IHC Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, 64 minutos	CC1, 64 minutos	ULTRA CC1 64 minutos, 100 °C
Inhibidor preprimario de peroxidasa	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
OptiView HQ Linker	8 minutos (predeterminado)		
OptiView HRP Multimer	8 minutos (predeterminado)		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Tabla 3. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) con ultraView Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	CC1, Estándar	ULTRA CC1 64 minutos, 95 °C
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».⁷

CONTROL DE REACTIVO NEGATIVO

Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9), se debe teñir un segundo portaobjetos con el reactivo de control negativo correspondiente.

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe incluir un control tisular en cada sesión de tinción. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una autopsia reciente, biopsia o cirugía preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

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

Como ejemplos de tejidos de control positivo para este anticuerpo se encuentran la amígdala o el ganglio linfático.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El patrón de tinción celular del anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) es nuclear.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

El sistema OptiView Detection es por lo general más sensible que el *ultraView* Universal DAB Detection Kit. El usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo y los sistemas de detección.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	3/3	Timo	3/3
Cerebelo	3/3	Médula ósea	3/3
Glándula suprarrenal	1/3	Pulmón	2/3
Ovario	2/3	Corazón	2/3
Páncreas	3/3	Esófago	3/3
Ganglio linfático	3/3	Estómago	3/3
Glándula paratiroidea	3/3	Intestino delgado	3/3
Glándula pituitaria	3/3	Colon	3/3
Testículos	3/3	Hígado	2/3
Tiroides	3/3	Glándula salival	2/3
Mama ^a	12/13	Riñón	2/3
Bazo	3/3	Próstata	1/3
Amígdala	3/3	Cuello del útero	4/4
Endometrio	2/3	Piel	3/3
Músculo esquelético	0/3	Mesotelio	0/3
Nervio	0/3	Vejiga	3/3

^a Entre los tejidos evaluados se encuentran las inflamaciones normales, hiperplásicas o crónicas.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	2/2
Meningioma (cerebro)	1/1
Oligodendroglioma (cerebro)	1/1
Carcinoma endometriode (ovario)	1/1
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	1/1
Neoplasia neuroendocrina pancreática (páncreas)	1/1
Adenocarcinoma (páncreas)	1/1
Seminoma (testículos)	1/1
Carcinoma embrionario (testículos)	1/1
Carcinoma medular (tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (tiroides)	1/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/1
Carcinoma ductal invasivo (mama)	120/124
Carcinoma lobulillar invasivo (mama)	5/5
Carcinoma mucinoso (mama)	1/1
Carcinoma neuroendocrino (mama)	1/1
Carcinoma medular (mama)	7/7
Adenosis (mama)	1/1
Carcinoma de mama (metastásico)	38/39
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	1/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	1/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	1/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (estómago)	1/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (intestino delgado)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	1/1
GIST (colon)	1/1
Adenocarcinoma (recto)	1/1
GIST (recto)	1/1
Melanoma (recto)	1/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma de células claras (riñón)	1/1
Adenocarcinoma (próstata)	2/2
Leiomioma (útero)	1/1
Adenocarcinoma (útero)	1/1
Carcinoma de células claras (útero)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	2/2
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	1/1
Carcinoma de células basales (piel)	1/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1
Neurofibroma (nervios)	1/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Rabdomiosarcoma polimorfo (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	1/1
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	2/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	1/1
Linfoma anaplásico de células grandes (ganglio linfático)	1/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	1/1
Leiomioma (vejiga)	1/1
Osteosarcoma (cartilago)	0/1
Leiomioma (músculo liso)	1/1

Precisión

Se llevaron a cabo estudios de precisión con el anticuerpo CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) para demostrar:

- La precisión entre lotes del anticuerpo.
- La precisión dentro de la sesión y entre días en un instrumento BenchMark ULTRA.
- La precisión entre instrumentos en los instrumentos BenchMark GX, BenchMark XT y BenchMark ULTRA.
- La precisión entre plataformas entre los instrumentos BenchMark XT, BenchMark GX y BenchMark ULTRA.

Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

Se demostró la precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos. Entre los estudios que se llevaron a cabo figuraban los de repetibilidad dentro del análisis y de precisión intermedia entre días y entre sesiones. Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

REFERENCIAS

1. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1566-1572.
2. Jurikova M, Danihel L, Polak S, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.* 2016;118(5):544-552.
3. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996;29(7):413-425.
4. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
5. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register.*

6. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
7. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

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

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

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

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el dispositivo médico a la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
F	Se han actualizado las secciones Material suministrado, Almacenamiento y estabilidad, Preparación de muestras, Advertencias y precauciones, Procedimiento de tinción, Control de tejido positivo, Rendimiento de análisis y Símbolos. Se ha añadido el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

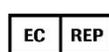
© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA INGLE MOZZA
PROFUMIGIOS ROCHE S.p.A. e l.
Divisione Diagnostica
DT & APPLICAZIONE LEGAL

CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody

REF 800-2912

05278775001

IVD  50

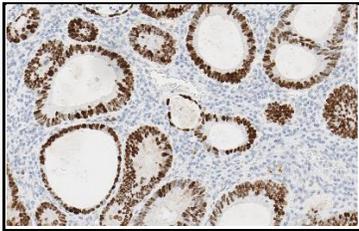


Figura 1. Observación de un patrón de tinción nuclear en adenocarcinoma de colon con el anticuerpo primario CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody.

USO PREVISTO

CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados. Este anticuerpo está destinado para

uso diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7)) detecta la proteína tumoral p53 (TP53), también conocida como p53. La proteína p53 es una proteína de unión al ADN de 43.7 kDa que se compone de 393 amino ácidos. La conforman seis dominios: el dominio I de activación de la transcripción (TAD I); el dominio II de activación de la transcripción (TAD II); la región rica en prolina (PRD); el dominio de la sección central, en la que se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD); el dominio de tetramerización (TD) y el dominio básico carboxiloterminales (BD).¹ p53 en su longitud total tiene la capacidad de formar tetrámeros de forma reversible a través del dominio TD.² La formación de tetrámeros de p53 es fundamental para la unión al sitio específico del ADN, para las modificaciones postraslacionales y las interacciones entre proteínas.²

La proteína p53 también desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad genómica, dado que detiene el ciclo celular en caso de estrés genómico e impide la proliferación de células con ADN dañado.²⁻⁵ La proteína p53 se conserva a niveles muy bajos en las células carentes de estímulos; sin embargo, en respuesta a determinados estímulos, como las lesiones en el ADN, la carencia de sustancias nutritivas, la reducción de los ribonucleótidos, la hipoxia, el estrés oxidativo y la hiperproliferación de señales, p53 se estabiliza y se acumula en las células.³ Una vez que se activa, p53 induce las modificaciones en la expresión del gen y favorece la interrupción del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN.^{3,6} Por tanto, la inactivación de p53 puede dar lugar a la proliferación y a la transformación de células afectadas.⁵

La detección de la proteína p53 en su estado silvestre y con mutación mediante inmunohistoquímica (IHC) con el anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) puede servir para aportar información auxiliar en cuanto a la acumulación de p53, hecho que se asocia con un trastorno de la regulación del ciclo celular y con la pérdida de oncoinhibición. Se puede utilizar como parte de un panel de estudios de IHC. El patrón de tinción es nuclear.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la proteína recombinante humana p53 de tipo silvestre. CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody se une a la proteína p53 en las secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE) y presenta un patrón de tinción nuclear. El anticuerpo puede visualizarse mediante *ultraView Universal DAB Detection Kit* (n.º cat. 760-500 / 05269806001) o *OptiView DAB IHC Detection Kit* (n.º cat. 760-700 / 06396500001). Consulte la hoja de datos correspondiente para obtener más información.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) contiene aproximadamente 2.5 µg de un anticuerpo monoclonal de ratón.

El anticuerpo se diluye en un tampón fosfato salino con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.05 %, un conservante.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 0.5 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) es un anticuerpo monoclonal de ratón producido como sobrenadante de una proteína A purificada.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Negative Control (Monoclonal) (n.º cat. 760-2014 / 05266670001)
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (n.º cat. 760-700 / 06396500001)
5. *ultraView Universal DAB Detection Kit* (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Equipo de laboratorio de uso general
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos VENTANA BenchMark IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %.⁷ Las secciones de tejido se deben cortar con un grosor aproximado de 4 µm y colocarse en portaobjetos cargados positivamente. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)

- No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
- La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
- Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
- Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{8,9}
- Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
- Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en dialog.roche.com.
- Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
- El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
- Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Normativa (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
	P272	Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, masa reactiva de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

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

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 800-2912.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) con ultraView Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	CC1, Estándar	ULTRA CC1, 64 minutos, (Estándar), 95 °C
Anticuerpo (Primario)	24 minutos, 37 °C	24 minutos, 37 °C	28 minutos, 36 °C
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Tabla 3. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) con OptiView DAB IHC Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, 32 minutos, 100 °C	CC1, 32 minutos, 100 °C	ULTRA CC1, 32 minutos, 100 °C
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Inhibidor preprimario de peroxidasa	Seleccionado		
OptiView HQ Linker	8 minutos (predeterminado)		
OptiView HRP Multimer	8 minutos (predeterminado)		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».¹⁰

CONTROL DE REACTIVO NEGATIVO

Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7), se debe teñir un segundo portaobjetos con el reactivo de control negativo correspondiente.

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Es necesario incluir un control de tejido positivo en cada sesión de procedimiento de tinción que se lleve a cabo. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una

tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

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

Como ejemplos de tejido de control positivo para este anticuerpo se encuentra el adenocarcinoma de colon, que debería presentar una tinción nuclear en la mayoría de las células neoplásicas.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El patrón de tinción celular del anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) es nuclear.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

La detección mediante el sistema OptiView es por lo general más sensible que la del sistema *ultraView* Universal DAB. El usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo y los sistemas de detección.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/3	Estómago	5/5
Cerebelo	0/3	Intestino delgado	2/3
Glándula suprarrenal	1/3	Colon ^b	4/7
Ovario	3/5	Apéndice	2/2
Páncreas	3/6	Hígado	0/6
Ganglio linfático	1/1	Glándula salival	3/3
Glándula paratiroidea	2/3	Faringe, cavidad oral	2/3
Glándula pituitaria	1/3	Riñón	2/3
Testículos	3/3	Próstata	3/3
Tiroides	2/3	Vejiga	3/3
Mama ^a	3/8	Endometrio	3/3
Bazo	0/3	Cuello del útero	3/3
Amígdala	4/4	Músculo esquelético	0/3
Timo	6/6	Piel	3/3
Médula ósea	0/3	Nervio	1/4
Pulmón	1/3	Mesotelio	3/3
Corazón	0/3	Tejido blando	1/2
Esófago	3/3		

^a Los tejidos que se evaluaron contenían mama normal y mama con modificaciones fibroquísticas.

^b Los tejidos que se evaluaron contenían colon normal y megacolon congénito.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	1/1
Meningioma (cerebro)	1/1
Ependimoma (cerebro)	1/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	1/1
Adenocarcinoma (cabeza y cuello)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cabeza y cuello)	1/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	37/49
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	11/13
Tumor de células de la granulosa (ovario)	1/1
Teratoma (ovario)	0/1
Cistoadenoma seroso (ovario)	1/1
Cistoadenoma mucinoso (ovario)	0/1
Cistoadenoma mixto de escasa malignidad (ovario)	1/1
Carcinoma endometriode (ovario)	25/28
Carcinoma de células claras (ovario)	1/2
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	1/1
Adenocarcinoma (páncreas)	1/1
Seminoma (testículos)	1/1
Carcinoma embrionario (testículos)	1/1
Carcinoma papilar (tiroides)	1/1
Carcinoma folicular (tiroides)	1/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	4/7
Carcinoma ductal invasivo (mama)	58/75
Carcinoma lobulillar invasivo (mama)	4/11
Adenoma cortical suprarrenal (glándula suprarrenal)	1/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Adenoma pleomórfico (glándula salival)	1/1
Tumor de Warthin (glándula salival)	1/1
Adenocarcinoma (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (estómago)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (estómago)	1/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
GIST (intestino delgado)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Adenocarcinoma (colon)	67/80
Carcinoma adenoescamoso (colon)	1/1
Adenocarcinoma mucinoso (colon)	9/10
Adenocarcinoma papilar (colon)	2/3
Adenoma, sin especificar (colon)	0/1
Adenoma tubular (colon)	2/2
Tumor neuroendocrino bien diferenciado (apéndice)	1/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Colangiocarcinoma (hígado)	1/1
Adenoma papilar (riñón)	1/1
Adenocarcinoma (próstata)	2/2
Carcinoma de células claras (útero)	1/1
Carcinoma endometrial (útero)	1/1
Leiomioma (útero)	0/1
Leiomioma (útero)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	1/1
Adenocarcinoma (endocérvix)	0/1
Rabdomiosarcoma alveolar (músculo)	1/1
Mixoma (músculo)	1/1
Carcinoma de células basales (piel)	1/1
Melanoma (piel)	1/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1
Neurilemoma maligno de nervios periféricos (nervio periférico)	1/1
Schwannoma (nervio periférico)	1/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	1/1
Carcinoma de células escamosas (vejiga)	1/1
Plasmacitoma (extramedular)	0/1
Mesotelioma (mesotelio)	1/1
Tumor fibroso solitario (pleura)	1/1
Angiosarcoma (tejido blando)	0/1
Liposarcoma (tejido blando)	1/1

Precisión

Se llevaron a cabo estudios de precisión con el anticuerpo CONFIRM anti-p53 (DO-7) para demostrar:

- La precisión entre lotes del anticuerpo.
- La precisión dentro de la sesión y entre días en un instrumento BenchMark ULTRA.
- La precisión entre instrumentos en los instrumentos BenchMark XT, BenchMark GX y BenchMark ULTRA.

- La precisión entre plataformas entre los instrumentos BenchMark GX, BenchMark XT y BenchMark ULTRA.

Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

Se demostró la precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos. Entre los estudios que se llevaron a cabo figuraban los de repetibilidad dentro del análisis y de precisión intermedia entre días y entre sesiones. Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

REFERENCIAS

1. Kim S, An SS. Role of P53 Isoforms and Aggregations in Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(26):e3993.
2. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, et al. Tetramer Formation of Tumor Suppressor Protein P53: Structure, Function, and Applications. *Biopolymers*. 2016;106(4):598-612.
3. Vieler M, Sanyal S. P53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(9).
4. Harris SL, Levine AJ. The P53 Pathway: Positive and Negative Feedback Loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-2908.
5. Powell DJ, Hrstka R, Candeias M, et al. Stress-Dependent Changes in the Properties of P53 Complexes by the Alternative Translation Product P53/47. *Cell Cycle*. 2008;7(7):950-959.
6. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The Role of Mutant P53 in Human Cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):116-126.
7. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
8. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register*.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
10. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

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

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

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

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el dispositivo médico a la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
F	Se han actualizado las secciones Preparación de muestras, Advertencias y precauciones, Procedimiento de tinción, Rendimiento de análisis y Símbolos. Se ha añadido el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO

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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA M.F.L. MAZZA
PRODUCIOS ROCHÉ S.A. de I.
Distrib. Distribución
DT & APODERADA LEGAL

Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody

REF 760-2542

05267102001

IVD  50

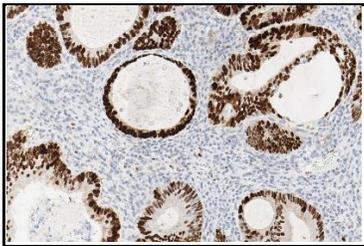


Figura 1. Tinción de un adenocarcinoma de colon con el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11).

USO PREVISTO

El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH.

La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información

clínica pertinente y los controles adecuados.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody detecta la proteína tumoral p53 (TP53), también conocida como p53. La proteína p53 es una proteína de unión al ADN de 43.7 kDa que se compone de 393 amino ácidos. La conforman seis dominios: el dominio I de activación de la transcripción (TAD I); el dominio II de activación de la transcripción (TAD II); la región rica en prolina (PRD); el dominio de la sección central, en la que se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD); el dominio de tetramerización (TD) y el dominio básico carboxiloterminales (BD).¹ p53 en su longitud total tiene la capacidad de formar tetrámeros de forma reversible a través del dominio TD.² La formación de tetrámeros de p53 es fundamental para la unión al sitio específico del ADN, para las modificaciones postraslacionales y las interacciones entre proteínas.²

La proteína p53 también desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad genómica, dado que detiene el ciclo celular en caso de estrés genómico e impide la proliferación de células con ADN dañado.^{2,3,4,5} La proteína p53 se conserva a niveles muy bajos en las células carentes de estímulos; sin embargo, en respuesta a determinados estímulos, como las lesiones en el ADN, la carencia de sustancias nutritivas, la reducción de los ribonucleótidos, la hipoxia, el estrés oxidativo y la hiperproliferación de señales, p53 se estabiliza y se acumula en las células.³ Una vez que se activa, p53 induce las modificaciones en la expresión del gen y favorece la interrupción del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN.^{3,6} Por tanto, la inactivación de p53 puede dar lugar a la proliferación y a la transformación de células afectadas.⁵

La detección de la proteína p53 en su estado silvestre y con mutación mediante inmunohistoquímica (IHC) con el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody puede servir para aportar información auxiliar en cuanto a la acumulación de p53, que se asocia con un trastorno de la regulación del ciclo celular y con la pérdida de oncoinhibición. Se puede utilizar como parte de un panel de estudios de IHC. El patrón de tinción es nuclear.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la proteína p53. El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody se une a la proteína p53 en secciones de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo puede visualizarse mediante *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001) o *OptiView* DAB IHC Detection Kit (n.º cat. 760-700 / 06396500001) en un instrumento BenchMark IHC/ISH. Consulte la hoja de datos correspondiente para obtener más información.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody contiene aproximadamente 12.5 µg de anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el epítipo presente en el anticuerpo p53 humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón fosfato salino que contiene una proteína transportadora y un conservante.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 2.5 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody es un anticuerpo monoclonal de ratón producido como sobrenadante de un cultivo celular purificado.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Negative Control (Monoclonal) (n.º cat. 760-2014 / 05266670001)
4. *OptiView* DAB IHC Detection Kit (n.º cat. 760-700 / 06396500001)
5. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
6. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (n.º cat. 760-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
14. Equipo de laboratorio de uso general
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10%.⁷ Las secciones de tejido se deben cortar con un grosor aproximado de 4 µm y colocarse en portaobjetos cargados positivamente. Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Solicite a su representante de servicio de Roche una copia de «Recommended Slide Storage and Handling» para obtener más información al respecto.

Es posible que se obtengan resultados variables como consecuencia de la fijación prolongada o bien de procesos especiales tales como la descalcificación en la preparación de la médula ósea.

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

Farm. ROBERTA MILI MAZZA
PRODUTTI ROCHE S.p.A. e. l.
Division Diagnostica
DT & APODERATA LEGAL

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
6. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
7. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{8,9}
8. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
9. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
10. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en dialog.roche.com.
11. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
12. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
13. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Normativa (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
	P272	Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
	P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, masa reactiva de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

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

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 760-2542.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody con ultraView Universal DAB Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Suave	CC1, Suave	ULTRA CC1, 36 minutos, (Suave), 95 °C
Anticuerpo (Primario)	24 minutos, 37 °C	24 minutos, 37 °C	32 minutos, 36 °C
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Tabla 3. Protocolo de tinción recomendado para el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody con OptiView DAB IHC Detection Kit en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Tipo de procedimiento	Método		
	GX	XT	ULTRA o ULTRA PLUS ^a
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, 32 minutos	CC1, 32 minutos	ULTRA CC1, 32 minutos, 100 °C
Anticuerpo (Primario)	12 minutos, 37 °C	16 minutos, 37 °C	12 minutos, 36 °C
Inhibidor preprimario de peroxidasa	Seleccionado		
OptiView HQ Linker	8 minutos (predeterminado)		
OptiView HRP Multimer	8 minutos (predeterminado)		
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos		
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos		

^a Se demostró la concordancia entre los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos.

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».¹⁰

CONTROL DE REACTIVO NEGATIVO

Además de la tinción con el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody, se debe teñir un segundo portaobjetos con el reactivo de control negativo correspondiente.

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe incluir un control de tejido positivo en cada sesión de tinción. La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad. El tejido de control puede contener células de tinción tanto positiva como negativa y ambas sirven como control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra de autopsia, biopsia o cirugía preparada o fijada reciente con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba.

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

Como ejemplos de tejido de control positivo para este anticuerpo se encuentra el adenocarcinoma de colon, que debería presentar una tinción nuclear en la mayoría de las células neoplásicas.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El patrón de tinción celular del anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody es nuclear.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

El sistema OptiView Detection es por lo general más sensible que el *ultraView* Universal DAB Detection kit. El usuario debe validar los resultados obtenidos con este reactivo y los sistemas de detección.

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/3	Intestino delgado	3/3
Cerebelo	3/3	Colon ^b	5/6
Glándula suprarrenal	2/3	Apéndice	1/2
Ovario	3/5	Hígado	0/5
Páncreas	5/5	Glándula salival	3/3
Ganglio linfático	2/2	Faringe, cavidad oral	2/3
Glándula pituitaria	2/3	Riñón	3/3
Testículos	3/3	Próstata	3/3
Tiroides	3/3	Vejiga	3/4
Mama ^a	6/8	Glándula paratiroidea	3/3
Bazo	0/3	Endometrio	3/3
Amígdala	5/5	Cuello del útero	3/3
Timo	3/3	Músculo esquelético	0/3
Médula ósea	0/3	Piel	3/3

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Pulmón	1/3	Nervio	0/3
Corazón	0/3	Mesotelio	3/3
Esófago	3/3	Tejido blando	0/3
Estómago	3/3		

^a Los tejidos que se evaluaron contenían mama normal y mama con modificaciones fibroquísticas.

^b Los tejidos que se evaluaron contenían colon normal y megacolon congénito.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	1/1
Meningioma (cerebro)	1/1
Ependimoma (cerebro)	1/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	1/1
Adenocarcinoma (cabeza y cuello)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cabeza y cuello)	1/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	32/49
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	11/17
Tumor de células de la granulosa (ovario)	1/1
Teratoma (ovario)	1/1
Cistoadenoma seroso (ovario)	1/1
Cistoadenoma mucinoso (ovario)	1/1
Cistoadenoma mixto de escasa malignidad (ovario)	1/1
Carcinoma endometriode (ovario)	24/28
Carcinoma de células claras (ovario)	2/2
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	1/1
Adenocarcinoma (páncreas)	1/1
Seminoma (testículos)	1/1
Carcinoma embrionario (testículos)	1/1
Carcinoma papilar (tiroides)	1/1
Carcinoma folicular (tiroides)	1/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	5/8
Carcinoma ductal invasivo (mama)	60/79
Carcinoma lobulillar invasivo (mama)	5/11
Adenocarcinoma mucinoso (mama)	1/1
Adenoma cortical suprarrenal (glándula suprarrenal)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Feocromocitoma (glándula suprarrenal)	1/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	1/1
Adenocarcinoma (pulmón)	1/1
Adenoma pleomórfico (glándula salival)	1/1
Tumor de Warthin (glándula salival)	1/1
Adenocarcinoma (esófago)	1/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (estómago)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (estómago)	1/1
Adenocarcinoma (intestino delgado)	0/1
GIST (intestino delgado)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	71/83
Carcinoma adenoescamoso (colon)	1/1
Adenocarcinoma mucinoso (colon)	8/8
Adenocarcinoma papilar (colon)	3/3
Adenoma, sin especificar (colon)	1/1
Adenoma tubular (colon)	0/1
Tumor neuroendocrino bien diferenciado (apéndice)	1/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Colangiocarcinoma (hígado)	1/1
Adenoma papilar (riñón)	1/1
Adenocarcinoma (próstata)	2/2
Carcinoma de células claras (útero)	1/1
Carcinoma endometrial (útero)	1/1
Leiomioma (útero)	0/1
Leiomiomasarcoma (útero)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	1/1
Adenocarcinoma (endocérvix)	1/1
Rabdomiosarcoma alveolar (músculo)	1/1
Mixoma (músculo)	1/1
Carcinoma de células basales (piel)	1/1
Melanoma (piel)	1/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1
Neurilemoma maligno de nervios periféricos (nervio periférico)	1/1
Schwannoma (nervio periférico)	1/1
Linfoma anaplásico de células grandes (ganglio linfático)	1/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma de células escamosas (vejiga)	1/1
Plasmacitoma (extramedular)	1/1
Mesotelioma (mesotelio)	1/1
Tumor fibroso solitario (pleura)	1/1
Angiosarcoma (tejido blando)	1/1
Liposarcoma (tejido blando)	1/1

Precisión

Se llevaron a cabo estudios de precisión con el anticuerpo Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody para demostrar:

- La precisión entre lotes del anticuerpo.
- La precisión dentro de la sesión y entre días en un instrumento BenchMark ULTRA.
- La precisión entre instrumentos en los instrumentos BenchMark GX, BenchMark XT y BenchMark ULTRA.
- La precisión entre plataformas entre los instrumentos BenchMark XT, BenchMark GX y BenchMark ULTRA.

Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

Se demostró la precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS mediante ensayos representativos. Entre los estudios que se llevaron a cabo figuraban los de repetibilidad dentro del análisis y de precisión intermedia entre días y entre sesiones. Todos los estudios cumplieron los criterios de aceptación.

REFERENCIAS

1. Kim S, An SS. Role of P53 Isoforms and Aggregations in Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(26):e3993.
2. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, et al. Tetramer Formation of Tumor Suppressor Protein P53: Structure, Function, and Applications. *Biopolymers*. 2016;106(4):598-612.
3. Vieler M, Sanyal S. P53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(9).
4. Harris SL, Levine AJ. The P53 Pathway: Positive and Negative Feedback Loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-2908.
5. Powell DJ, Hrstka R, Candeias M, et al. Stress-Dependent Changes in the Properties of P53 Complexes by the Alternative Translation Product P53/47. *Cell Cycle*. 2008;7(7):950-959.
6. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The Role of Mutant P53 in Human Cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):116-126.
7. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
8. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
10. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.

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

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

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

Farm. ROCHETA S.p.A. MOZZA
 PRODOTTI ROCHETA S.p.A. e l.
 Divisione Diagnostica
 DT & APODERATA LEGAL

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el dispositivo médico a la Unión Europea

TABLA DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
D	Se han actualizado las secciones Preparación de muestras, Advertencias y precauciones, Procedimiento de tinción, Rendimiento de análisis y Símbolos. Se ha añadido el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

PROPIEDAD INTELECTUAL

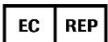
VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW, *ultraView* y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche. Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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



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



Farm. ROMERTA MILLEMOZZA
PRODUTTORE ROCHE S.p.A. e l.
Divisione Diagnostica
DT & APODERADA LEGAL

CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4324  50

05278406001

REF 790-4325  250

05278414001

IVD

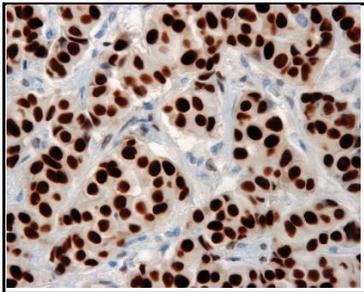


Figura 1. Tinción del carcinoma lobulillar de mama con el anticuerpo CONFIRM anti ER (SP1)

USO PREVISTO

CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1)) está destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente

en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Uso exclusivo con receta médica.

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) es un anticuerpo monoclonal de conejo que detecta la presencia del receptor de estrógeno alfa humano (ER). El ER es un receptor de hormonas nuclear codificado por dos genes diferentes, ESR1 y ESR2, que transcriben las isoformas alfa y beta respectivamente.^{1,2} ER alfa es la expresión de la isoforma primaria en células epiteliales lumbales de tejido mamario.^{1,2} La actividad del ER estimula el desarrollo normal de la glándula mamaria y es necesaria para la diferenciación y la proliferación en el epitelio mamario adulto.^{3,4} En las células neoplásicas, la hiperactividad del ER, provocada por una sobreexpresión del receptor, da lugar a una serie de eventos celulares cuyo resultado es la hiperproliferación y la formación de tumores.⁵

El cáncer de mama es la causa principal de mortalidad por cáncer en mujeres.⁶ El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad depende de su detección precoz junto con una estrategia de tratamiento adecuada basada en factores pronósticos y predictivos.^{7,8} En 1973 se identificó la capacidad del ER para indicar el pronóstico en el cáncer de mama y su valor a la hora de predecir la respuesta al tratamiento endocrino se evaluó mediante una cohorte muy amplia en 1986.^{9,10} Desde entonces, el ER se ha convertido en un modelo de marcador tumoral que sirve para el control de pacientes con cáncer de mama. La presencia de una elevada concentración del ER en el tumor mamario está relacionada con una respuesta más eficaz a la terapia endocrina.^{7,8} El conocimiento del estado del ER desempeña un papel importante en la elección del tratamiento para la paciente, pero no puede ser el único factor que se tenga en cuenta.^{7,8} Varios estudios han demostrado que la presencia del ER está asociada a un pronóstico favorable a largo plazo.^{10,11}

Las directrices clínicas y las pautas de las prácticas recomendadas indican que el estado del ER se debe evaluar en todos los casos de cáncer de mama primario invasivo para

identificar a las pacientes que tienen más probabilidades de responder a los tratamientos de tipo endocrino.^{7,8} Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno bloquean el crecimiento del cáncer inducido por el estrógeno moderando la hiperactividad del ER y se utilizan en terapias endocrinas (hormonales) en pacientes que presentan una sobreexpresión del receptor.^{8,12} En la actualidad, la primera opción de tratamiento para los carcinomas positivos en el ER es el tamoxifeno.^{7,8}

Las directrices y las pautas de las prácticas recomendadas hacen hincapié en que el método preferible para detectar el ER en el cáncer de mama es la inmunohistoquímica (IHC).¹³ Los estudios de amplias cohortes de casos de cáncer de mama invasivos concluyen que el clon anti-ER SP1 ofrece mayor sensibilidad para la detección del ER que los clones monoclonales de ratón 1D5 y 6F11.^{14,15} La detección mediante IHC del ER con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) puede servir como ayuda en el control, el pronóstico y la predicción de la terapia hormonal en el tratamiento del carcinoma de mama.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se une al ER en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE). El anticuerpo específico se puede localizar mediante una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que detecte inmunoglobulinas de conejo, seguida de la incorporación de un conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) estreptavidina (MIEW DAB Detection Kit) o mediante un conjugado de anticuerpo secundario y peroxidasa de rábano (HRP) (*ultraView* Universal DAB Detection Kit). El complejo anticuerpo-enzima específico se puede visualizar a través del precipitado del producto de la reacción enzimática. Los casos clínicos se deberían evaluar dentro del contexto del rendimiento de los controles correspondientes. Ventana recomienda la incorporación de un control de tejido positivo fijado y procesado con el mismo método que la muestra de la paciente (por ejemplo, un carcinoma de mama o de útero positivo débil). Además de la tinción con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1), se debe teñir un segundo portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Para que la prueba tenga validez, el tejido de control positivo debe presentar tinción nuclear de las células tumorales o de las glándulas uterinas y el estroma. Todos estos componentes deben dar resultado negativo en la tinción con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Además, se recomienda incluir un portaobjetos de control tisular negativo (como un carcinoma de mama negativo en el ER) en cada lote de muestras que se procesen y se analicen en el instrumento BenchMark IHC/ISH. Este control tisular negativo debería teñirse con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) para garantizar que la ampliación del antígeno y el resto de procedimientos previos al tratamiento no generan falsos positivos en las tinciones.

MATERIAL SUMINISTRADO

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º cat. 790-4324) contiene reactivo suficiente para 50 pruebas.

Un dispensador de 5 mL de anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) contiene aproximadamente 5 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno ER humano.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º cat. 790-4325) contiene reactivo suficiente para 250 pruebas.

Un dispensador de 25 mL de anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) contiene aproximadamente 25 µg de anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra el antígeno ER humano.

El anticuerpo se diluye en un tampón formado por Tris-HCl con una proteína transportadora y ProClin 300 al 0.10 %, un conservante. Existen trazas (~ 0.2 %) de suero bovino fetal con origen en Estados Unidos de la solución de partida.

La concentración del anticuerpo específico es aproximadamente de 1 µg/mL. No se ha observado ninguna reactividad del anticuerpo no específica conocida en este producto.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) es un anticuerpo monoclonal de conejo producido como sobrenadante de cultivo celular.

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

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

Farm. ROBERTA MILE MOZZA
PRODOTTI ROCHE S.p.A. del.
Divisione Diagnostica
DT & APPLICAZIONE LEGAL

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

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

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. CONFIRM Negative Control Rabbit Ig (n.º cat. 760-1029 / 05266238001)
4. *ultraView* Universal DAB Detection Kit (n.º cat. 760-500 / 05269806001)
5. *VIEW* DAB Detection Kit (n.º cat. 760-091 / 05266157001)
6. A/B Block (Endogenous Biotin Blocking Kit) (n.º cat. 760-050 / 05266092001)
7. EZ Prep Concentrate (10X) (n.º cat. 950-102 / 05279771001)
8. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n.º cat. 950-300 / 05353955001)
9. LCS (Predilute) (n.º cat. 650-010 / 05264839001)
10. ULTRA LCS (Predilute) (n.º cat. 650-210 / 05424534001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (n.º cat. 950-124 / 05279801001)
12. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n.º cat. 950-224 / 05424569001)
13. Hematoxylin II (n.º cat. 790-2208 / 05277965001)
14. Bluing Reagent (n.º cat. 760-2037 / 05266769001)
15. Instrumento BenchMark IHC/ISH
16. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

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

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

Todos los dispensadores de anticuerpos tienen una fecha de caducidad. Si se almacena correctamente, el reactivo se mantendrá estable hasta la fecha indicada en la etiqueta. No usar el reactivo después de la fecha de caducidad.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual resultan adecuados para su uso con este anticuerpo primario cuando se utilizan con los kits de detección de VENTANA y los instrumentos BenchMark IHC/ISH. Para procesar las muestras, se recomienda seguir los pasos que aparecen a continuación:¹⁶

1. Coloque la muestra en formol tamponado neutro al 10 %. La cantidad usada es de entre 15 y 20 veces el volumen de tejido. Ningún fijador se infiltrará en tejido sólido de más de 2 o 3 mm ni en tejido poroso de 5 mm durante un periodo de 24 horas. Las secciones de tejido de 3 mm o de tamaño inferior deben fijarse durante al menos 4 horas y un máximo de 8 horas. La fijación se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (entre 15-25 °C).
2. Después de la fijación, la muestra debe colocarse en un instrumento de procesamiento de tejidos para prepararla durante la noche. En resumen, el proceso consiste en deshidratar la muestra con alcoholes y, a continuación, eliminar estos mediante reactivos de aclarado para finalmente llevar a cabo la infiltración con parafina.
3. Las muestras se embeben con parafina en casetes de tejido y se cortan secciones de aproximadamente 4 µm de grosor que se centran y se recogen en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos deberán ser del tipo Superfrost Plus o equivalente. El tejido deberá dejarse secar al aire colocando los portaobjetos a temperatura ambiente durante la noche o en un horno a 60 °C durante 30 minutos.

Los portaobjetos deben teñirse inmediatamente, ya que la antigenicidad de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo.

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. La solución ProClin 300 se utiliza como conservante en este reactivo. Está clasificada como irritante y puede ocasionar sensibilización por contacto con la piel.

6. Adopte precauciones razonables cuando la manipule. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Utilice ropa protectora y guantes.
7. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
8. Este producto contiene un 1 % de suero bovino o una cantidad menor, que se utiliza en la producción del anticuerpo.
9. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{17,18}
10. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
11. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
12. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark IHC/ISH y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios que puede encontrar en dialog.roche.com.
13. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
14. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
15. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información sobre riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P261	Evite inhalar la niebla o los vapores.
	P273	Evitar su emisión al medio ambiente.
	P280	Llevar guantes de protección.
	P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362 + P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
P501	Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada.	

Este producto contiene CAS n.º 55965-84-9, una masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Los anticuerpos primarios VENTANA se han desarrollado para su uso en los instrumentos BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección de VENTANA y sus accesorios. Consulte Tabla 2 y Tabla 3 para ver los protocolos de tinción recomendados.

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

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

Para obtener más información sobre el uso correcto de este dispositivo, consulte la hoja de datos del dispensador en línea asociado con P/N 790-4324 o P/N 790-4325.

La verificación y validación de los procedimientos de tinción recomendados en cada kit de detección se demuestran mediante pruebas de control de diseño y resultados de estudios clínicos.

Cualquier modificación que se realice en los procedimientos de tinción recomendados anulará las características de rendimiento que se suministran en esta hoja de datos. El usuario deberá hacerse responsable de las modificaciones que realice en el procedimiento de tinción recomendado.

Tabla 2. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con *ultraView Universal DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

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

Tabla 3. Protocolos de tinción recomendados para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con *VIEW DAB Detection Kit* en instrumentos BenchMark IHC/ISH

Tipo de procedimiento	Método	
	XT	ULTRA
Desparafinado	Seleccionado	Seleccionado
Acondicionamiento celular (desenmascaramiento del antígeno)	CC1, Estándar	ULTRA CC1, Estándar
Anticuerpo (Primario)	16 minutos, 37 °C	16 minutos, 36 °C
Bloque A/B (Bloqueador de biotina)	Necesario	Necesario
Contratinción	Hematoxylin II, 4 minutos	Hematoxylin II, 4 minutos
Post-contratinción	Bluing, 4 minutos	Bluing, 4 minutos

Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, así como a las condiciones generales de los instrumentos y del entorno del laboratorio, puede que sea necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario, el acondicionamiento celular o tratamiento previo de la proteasa en función de las muestras particulares, de la detección que se haya utilizado y de las preferencias del lector. Para obtener más información sobre las variables de fijación, consulte «Immunohistochemistry Principles and Advances».¹⁹

CONTROL DE TEJIDO POSITIVO

Se debe incluir un control de tejido positivo en cada sesión de tinción. El College of American Pathologists recomienda que el control de tejido positivo se encuentre en el portaobjetos de la paciente.¹³ Como ejemplo de control de tejido positivo para el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se encuentra el carcinoma de mama positivo débil. Las células o componentes de tejido con tinción positiva (tinción nuclear de células tumorales) se utilizan para confirmar que el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se ha aplicado y que el instrumento ha funcionado correctamente. El tejido de control puede contener células o elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como tejidos de control positivo y negativo. El tejido de control debe ser una muestra extraída recientemente de autopsia, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de prueba. Estos tejidos se

utilizarán para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el proceso, desde la preparación del tejido hasta la tinción. El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actuará como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos.

Para conseguir un control de calidad óptimo y detectar niveles sin importancia de degradación del reactivo es más recomendable utilizar un tejido con tinción positiva débil que uno con tinción positiva fuerte. La opción más idónea es elegir un tejido de carcinoma de mama, que se caracteriza por una tinción débil pero positiva, para garantizar que el sistema es sensible a pequeños niveles de degradación de reactivos o a problemas con la metodología IHC.

Si no es posible, se puede utilizar endometrio proliferativo normal humano como control positivo. Los componentes de tinción positiva son la tinción nuclear de epitelios glandulares y células estromales y de músculo liso. Es posible, no obstante, que la tinción del tejido endometrial no sea lo suficientemente débil para detectar niveles bajos de degradación de los reactivos o problemas con la metodología IHC.

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. Un tejido con una tinción débil positiva es más adecuado para el control de calidad.

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

CONTROL TISULAR NEGATIVO

Con un control tisular que se haya fijado, procesado y embebido de la misma forma que las muestras de la paciente se puede verificar en cada sesión de tinción la especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) para detectar ER, así como proporcionar una indicación sobre una tinción de fondo específica (falsos positivos en la tinción). Además, incluir una variedad de tipos de células diferentes en la mayor parte de las secciones de tejido puede servir como control negativo para comprobar las especificaciones de rendimiento del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Por ejemplo, el mismo tejido (endometrio) que se utiliza como control de tejido positivo puede servir como control de tejido negativo. Los componentes que no van a tener tinción, como el citoplasma y la membrana celular, deberían mostrar la ausencia de una tinción específica en aquellas células que no está previsto que se tiñan, facilitando una indicación sobre la tinción de fondo específica. El control de tejido negativo también puede servir de ayuda en la interpretación de los resultados. La variedad de los diferentes tipos de células presentes en la mayor parte de las secciones de tejido suele ofrecer puntos de control negativo, pero es necesaria su comprobación por parte del usuario. Si se presenta una tinción específica en los puntos de control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

CONTROL DE REACTIVO NEGATIVO

Se debe utilizar el control de reactivo negativo de cada muestra en cada sesión como ayuda para la interpretación de los resultados. El control de reactivo negativo se utiliza en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción no específica y permitir que se interprete de forma más precisa la tinción específica en el sitio del antígeno. Todo ello indica la tinción de fondo no específica en cada portaobjetos. En lugar del anticuerpo primario, tiña el portaobjetos con CONFIRM Negative Control Rabbit Ig, un IgG purificado de conejo no inmune que no reacciona con muestras humanas. Si se utiliza un control de reactivo negativo diferente, dilúyalo con Antibody Diluent en la misma proporción de dilución que el antisuero del anticuerpo primario. En el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) existe una retención de aproximadamente el 0.2 % de suero bovino fetal. También se considera adecuada la incorporación de un 0.2 % de suero bovino fetal a Antibody Diluent para usarlo como control de reactivo negativo no específico. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser idéntico al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, la presencia de un control de reactivo negativo en un portaobjetos puede servir como control de fondo de unión no específica o negativa de otros anticuerpos.

VERIFICACIÓN DEL ENSAYO

Antes de usar por primera vez el anticuerpo en un procedimiento diagnóstico, o ante un cambio de lote, es necesario comprobar la especificidad del anticuerpo llevando a cabo una tinción de varios tejidos negativos y positivos cuyas características de rendimiento se conocen de antemano. Consulte los procedimientos de control de calidad que se han

mencionado previamente en esta sección del prospecto y las recomendaciones de control de calidad de College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist o CLSI Approved Guideline o todos ellos.^{20,21} Estos procedimientos de control de calidad deberían repetirse cada vez que se utilice un lote de anticuerpo nuevo, cuando se cambie el número de lote de uno de los reactivos del conjunto correspondiente o se modifiquen los parámetros del ensayo. El control de calidad no se puede llevar a cabo de forma significativa en un reactivo independiente de manera aislada, ya que los reactivos correspondientes, así como el protocolo del ensayo, se deben probar al mismo tiempo antes de utilizar un kit con fines de diagnóstico. Los tejidos que se enumeran en el Resumen de resultados previstos son aptos para llevar a cabo la verificación del ensayo.

Es necesario llevar a cabo todos los procedimientos de control de calidad de acuerdo con las normativas locales, estatales y federales o con los criterios de acreditación.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

El procedimiento de inmunotinción automatizada VENTANA provoca que un producto de reacción con color se precipite en los puntos del antígeno que localiza el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Un anatomopatólogo cualificado con experiencia en procedimientos de inmunohistoquímica debe evaluar los controles positivos y negativos y calificar el producto con tinción antes de interpretar los resultados. El estado del receptor de estrógeno se determina mediante el porcentaje de células tumorales con tinción. Para considerar que el resultado de un caso es positivo en ER, debe observarse una tinción en el núcleo de las células tumorales igual o superior al 1%.¹³ Es posible que haya presencia de tinción específica en el estroma y los linfocitos. Al evaluar estos portaobjetos es indispensable tener en cuenta únicamente la tinción nuclear que presentan las células tumorales.

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) debería estudiarse primero para comprobar que los reactivos funcionan correctamente. La existencia de un producto de reacción marrón (3,3' tetracloruro de diaminobencidina, DAB) en los núcleos de las células diana indica una reactividad positiva. Como ejemplo de tejidos que pueden servir como control positivo se encuentra el carcinoma de mama positivo débil conocido, es decir, el tejido en el que $\geq 1\%$ de los núcleos de las células tumorales presenten una tinción positiva. También es posible utilizar el endometrio humano normal. En el caso del endometrio normal, la tinción del ER se observa en los núcleos de las glándulas y el estroma endometriales. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva adecuada, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos.

Control tisular negativo

El control tisular negativo se debe estudiar después del control de tejido positivo para comprobar el etiquetado específico del antígeno diana mediante el anticuerpo primario. La ausencia de una tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. El carcinoma de mama que se utiliza como control positivo también puede servir como tejido de control negativo. Ciertos elementos estromales, como las células endoteliales, cuya tinción negativa en el ER se ha demostrado, no deberían presentar tinción nuclear. Si se presenta una tinción específica en el control tisular negativo, deberán considerarse no válidos los resultados en la muestra del paciente.

De presentarse tinción no específica, tendrá una apariencia difusa. También es posible observar una ligera tinción esporádica en el tejido conjuntivo en aquellas secciones de tejido que se han fijado excesivamente con formol. Se deben utilizar células intactas para la interpretación de los resultados de tinción, ya que en las células necróticas o degeneradas se suele observar una tinción no específica.²²

Tejido del paciente

La tinción de muestras del paciente con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se debe estudiar en último lugar. La intensidad de la tinción positiva deberá evaluarse en contexto junto con la tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Es posible detectar ER entre otras neoplasias, como en el cáncer de ovario y de endometrio.¹³ La morfología de cada muestra de tejido también se deberá estudiar a través de una sección con tinción de hematoxilina y eosina cuando se esté interpretando cualquier resultado de inmunohistoquímica. La interpretación de las conclusiones morfológicas del paciente y los datos clínicos pertinentes deben dejarse en manos de un anatomopatólogo cualificado. Para obtener más información sobre la inmunoreactividad, consulte las secciones Resumen y explicación, Limitaciones y Resumen de los resultados previstos.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica (IHC) es un proceso de diagnóstico que comprende varios pasos y requiere una formación especializada en cuanto a la correcta elección de los tejidos y los reactivos, la fijación, el procesamiento, la preparación de portaobjetos de inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de la tinción.
2. La tinción del tejido depende del manejo y el procesamiento del tejido antes de llevar a cabo la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento y seccionado incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede provocar la aparición de artefactos, el enmascaramiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. La existencia de resultados incoherentes puede ser consecuencia de la introducción de variaciones en los métodos de fijación e inclusión o puede derivarse de las irregularidades características del tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en riesgo la interpretación correcta de los resultados.
4. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, al igual que su ausencia, es algo que se debe evaluar en función del contexto del historial médico, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de todas las tinciones, o la ausencia de estas, se debe complementar con los estudios morfológicos y los controles correspondientes, así como con otras pruebas diagnósticas. Está previsto que este anticuerpo se use en un panel de anticuerpos. Es responsabilidad del anatomopatólogo cualificado estar familiarizado con los anticuerpos, los reactivos y los métodos que se utilizan para preparar la tinción. La tinción se debe llevar a cabo en un laboratorio certificado y con licencia y bajo la supervisión de un anatomopatólogo, que será el responsable de revisar los portaobjetos teñidos y de garantizar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
5. Ventana proporciona anticuerpos y reactivos con una dilución óptima para su uso siempre que se respeten las instrucciones que se suministran. Cualquier diferencia en la forma de llevar a cabo los procedimientos de prueba recomendados pueden invalidar los resultados previstos. Deben emplearse los controles adecuados y documentarlos. Los usuarios que no sigan los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación de los resultados de la paciente.
6. Este producto no se ha concebido para su uso en citometría de flujo; sus características de rendimiento no se han definido.
7. Los reactivos pueden mostrar reacciones imprevistas en tejidos que no se hayan probado previamente. Existe la posibilidad, aunque sea remota, de encontrarse con reacciones no previstas incluso en los grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo, dada la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos anatomopatológicos.²² Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si cuenta con reacciones imprevistas documentadas.
8. En los tejidos de pacientes contagiados con el virus de la hepatitis B o que contienen antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) es posible que se presente una tinción no específica con la peroxidasa de rábano.²³
9. Cuando se utilizan en los pasos de bloqueo, el suero normal de la misma fuente animal que el antisuero secundario pueden dar lugar a resultados de tinción falsos positivos o falsos negativos debido a la existencia de autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
10. Los resultados falsos positivos se pueden observar por la unión de proteínas no inmunológicas o por los productos de reacción con sustratos. También es posible que aparezcan como consecuencia de la actividad pseudoperoxidasa (eritrocitos), de la actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o de la biotina endógena (como en el caso del hígado, del cerebro, de la mama o del riñón) en función del tipo de inmunotinción que se haya utilizado.²⁴
11. Como ocurre en todas las pruebas de IHC, un resultado negativo significa que no se ha detectado el antígeno, no necesariamente que este no esté presente en las células o en el tejido que se ha usado para el ensayo.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

1. El anticuerpo, cuando se utiliza junto con los kit de detección y los accesorios VENTANA, detecta el antígeno que permanece una vez se han llevado a cabo la fijación en formol, el procesamiento del tejido y el corte. Los usuarios que no sigan

- los procedimientos de prueba recomendados deberán hacerse responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.
- Un resultado negativo con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) no descarta la presencia de ER. Las reacciones negativas en los carcinomas de mama pueden ser consecuencia de la pérdida de la expresión del antígeno o de una marcada reducción de esta. Se recomienda, por tanto, que se utilice el anticuerpo como parte de un panel que incluya el receptor de progesterona.
 - Es posible que no estén todos los ensayos registrados en cada instrumento. Póngase en contacto con el representante local de servicio Roche para obtener más información.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

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

Sensibilidad y especificidad

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos normales. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos positivos/total	Tejido	N.º de casos positivos/total
Cerebro	0/5	Esófago	0/3
Cerebelo	0/3	Estómago	0/3
Glándula suprarrenal	0/3	Intestino delgado	0/3
Ovario	1/3	Colon	0/3
Páncreas	0/3	Hígado	0/3
Glándula paratiroidea	0/4	Glándula salival	0/3
Glándula pituitaria	3/3	Riñón	0/3
Testículos	0/3	Próstata	2/3
Tiroides	1/5	Vejiga	0/5
Mama ^a	12/12	Endometrio	3/3
Bazo	0/3	Cuello del útero	1/3
Amígdala	1/3	Músculo esquelético	0/3
Timo	0/3	Piel ^b	0/5
Médula ósea	0/3	Nervio	0/3
Pulmón	0/3	Mesotelio	0/3
Corazón	0/3		

^a Entre los tejidos había tejido fibroadiposo.

^b En los tejidos se encontraba tejido de pezón.

La inmunorreactividad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó mediante la tinción de varios casos de tejidos humanos neoplásicos. Los casos se consideraban positivos en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³ Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. La sensibilidad/especificidad del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se determinó analizando una variedad de tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos positivos/total
Glioblastoma (cerebro)	0/1
Meningioma (cerebro)	0/1
Ependimoma (cerebro)	0/1
Oligodendroglioma (cerebelo)	0/1
Adenocarcinoma seroso (ovario)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (ovario)	0/1
Neoplasia neuroendocrina (páncreas)	0/1
Adenocarcinoma (páncreas)	0/1
Seminoma (testículos)	0/1
Carcinoma embrionario (testículos)	0/1
Carcinoma medular (tiroides)	0/1
Carcinoma papilar (tiroides)	0/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/3
Carcinoma ductal invasivo (mama)	9/20
Carcinoma lobulillar invasivo (mama)	2/3
Carcinoma medular (mama)	0/1
Carcinoma papilar (mama)	1/1
Carcinoma de mama (metastásico)	0/5
Linfoma de linfocitos B; sin especificar (bazo)	0/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	0/1
Adenocarcinoma (pulmón)	0/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	0/1
Adenocarcinoma (esófago)	0/1
Adenocarcinoma mucinoso (estómago)	0/1
Adenocarcinoma (intestino)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (intestino)	0/1
Adenocarcinoma (colon)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (colon)	0/1
Adenocarcinoma (recto)	0/1
Neoplasia maligna mesenquimatosa mixta (recto)	0/1
Melanoma (recto)	0/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	0/1
Hepatoblastoma (hígado)	0/1
Carcinoma de células claras (riñón)	0/1
Adenocarcinoma (próstata)	1/1

Patología	N.º de casos positivos/total
Carcinoma urotelial (uretra prostática)	1/1
Leiomioma (útero)	1/1
Adenocarcinoma (útero)	2/2
Carcinoma de células claras (útero)	0/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	0/1
Rabdomiosarcoma embrionario (músculo estriado)	0/1
Carcinoma de células basales (piel)	0/1
Carcinoma de células escamosas (músculo estriado)	0/1
Neurofibroma (mediastino)	0/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	0/1
Rabdomiosarcoma de células fusiformes (retroperitoneo)	0/1
Mesotelioma (peritoneo)	0/1
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	0/1
Linfoma, sin especificar (ganglio linfático)	0/2
Linfoma de linfocitos B, sin especificar (ganglio linfático)	0/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	0/1
Osteosarcoma (hueso)	0/1
Leiomiomasarcoma (músculo liso)	0/1

La sensibilidad depende de la conservación del antígeno. El manejo incorrecto del tejido durante el fijado, el corte, la inclusión o el almacenamiento puede modificar la antigenicidad y debilitar la capacidad de detección de ER que tiene el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1), lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Precisión de los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de seis casos de tejidos independientes. De los seis tejidos, dos presentaban una elevada expresión de ER; en dos se observaba una expresión reducida de ER y los otros dos daban resultado negativo en ER en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1 y 10 % y elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de nueve portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark XT. Esta misma configuración se utilizó también en el instrumento BenchMark ULTRA. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los instrumentos BenchMark XT y BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en todos los tejidos positivos de los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark XT, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark XT independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark XT concordaba al 100 % en los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA, se realizó la tinción de cuatro portaobjetos de seis casos con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark ULTRA independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA concordaba al 100 % en los seis casos. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Precisión del instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Para llevar a cabo la prueba de precisión, se realizó la tinción de nueve casos de tejidos independientes. De los nueve tejidos, tres presentaban una elevada expresión de ER; en tres se observaba una expresión reducida de ER y los otros tres daban resultado negativo en ER en función de la siguiente línea de corte: resultado negativo si existía una tinción de células tumorales < 1 %; expresión reducida si el valor se encontraba entre 1-10 %; y elevada si el valor era > 10 %.

Para llevar a cabo la prueba de repetibilidad dentro del análisis, se realizó la tinción de cinco portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La concordancia de la repetibilidad dentro del análisis del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS fue del 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre días, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) y un portaobjetos de cada caso se tiñó con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig en cinco sesiones independientes no consecutivas ejecutadas en un periodo de 20 días en el mismo instrumento BenchMark ULTRA PLUS. La precisión intermedia entre días del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS concordaba al 100 %. Los portaobjetos con tinción de CONFIRM Negative Control Rabbit Ig se consideraron aceptables en cuanto a señal y fondo.

Para llevar a cabo la prueba de precisión intermedia entre instrumentos BenchMark ULTRA PLUS, se realizó la tinción de dos portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS independientes. Se tiñó un solo portaobjetos de cada caso con el anticuerpo CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. La precisión intermedia entre instrumentos del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en los tres instrumentos BenchMark ULTRA PLUS era del 100 %.

Reproducibilidad entre laboratorios

Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad entre laboratorios con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) con una sesión de 14 portaobjetos de cáncer de mama (8 positivos, 2 con positividad reducida y 4 negativos) en 3 instrumentos BenchMark XT y 3 instrumentos BenchMark ULTRA, con detección *VIEW DAB* y detección *ultraView DAB* en cada uno de los 5 días no consecutivos durante un periodo mínimo de 20 días en 3 laboratorios externos. Las muestras se asignaron de forma aleatorizada y fueron evaluadas por 6 anatomopatólogos (2 por cada centro) para obtener el porcentaje de células tumorales con tinción. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales invasivas.¹³

En cuanto a la precisión entre sitios, los porcentajes del promedio de concordancia positiva (APA) y del promedio de concordancia negativa (ANA) en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 94.3 % y 87.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*; del 94.2 % y 85.8 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 95.6 % y del 90.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 94.2 % y 85.3 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante el *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre días, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 97.9 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*;

del 98.4 % y 96.2 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 98.0 % y 95.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 98.2 % y 95.5 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre lectores, los porcentajes de APA y ANA en la evaluación clínica del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) fueron del 95.7 % y 90.9 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *VIEW*; del 94.1 % y 85.7 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark ULTRA con detección mediante *ultraView*; del 94.9 % y 89.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *VIEW*; y del 93.4 % y 83.6 %, respectivamente, en el instrumento BenchMark XT con detección mediante *ultraView*.

En cuanto a la precisión entre plataformas en los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, los porcentajes de APA y ANA fueron del 97.8 % y 95.5 %, respectivamente, con detección de *VIEW* y del 98.9 % y 97.4 %, respectivamente, con detección de *ultraView*.

Con respecto a la precisión dentro de la misma plataforma, los porcentajes de APA y ANA fueron del 97.9% y 95.2%, respectivamente, con el instrumento BenchMark ULTRA; y del 97.8% y 95.0%, respectivamente, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Comparativa entre *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1)

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se utilizó para llevar a cabo una prueba comparativa de detección entre dos instrumentos (BenchMark XT y BenchMark ULTRA) con *VIEW* DAB Detection Kit y *ultraView* Universal DAB Detection Kit. La prueba se realizó con ciento noventa y nueve (199) casos de tejido. De los casos que se analizaron se pudo determinar, mediante el instrumento BenchMark ULTRA, que 111 eran positivos y 83 negativos en función del porcentaje de células tumorales que presentaba tinción. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, un 1 % de las células tumorales.

Los índices de aceptabilidad de la morfología y del fondo fueron del 100 % tanto en los kit de detección como en los instrumentos. Las comparaciones directas de las evaluaciones clínicas positivas y negativas entre los kit de detección en cada uno de los instrumentos se muestran en la Tabla 6, en el caso del instrumento BenchMark ULTRA, y en la Tabla 7, en el caso del instrumento BenchMark XT.

Tabla 6. Evaluación de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	108	3	111
Negativa	3	80	83
Total	111	83	194
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	108/111	97.3 (92.4-99.1)	
Porcentaje de concordancia negativa	80/83	96.4 (89.9-98.8)	
Porcentaje de concordancia global	188/194	96.6 (93.4-98.6)	

Tabla 7. Evaluación de *ultraView* Universal DAB Detection Kit frente a *VIEW* DAB Detection Kit en el instrumento BenchMark XT.

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	106	5	111
Negativa	2	79	81
Total	108	84	192

<i>ultraView</i> Universal DAB Detection Kit	<i>VIEW</i> DAB Detection Kit		
	Positiva	Negativa	Total
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	106/108	98.1 (93.5-99.5)	
Porcentaje de concordancia negativa	79/84	94.0 (86.8-97.4)	
Porcentaje de concordancia global	185/192	96.4 (92.7-98.2)	

La concordancia global de la evaluación entre los kit de detección en ambas plataformas fue del 96.9 % (n = 194) y del 96.4 % (n = 192) en el caso de los instrumentos BenchMark ULTRA y BenchMark XT, respectivamente. *ultraView* Universal DAB Detection Kit, en comparación con el *VIEW* DAB Detection Kit, obtuvo un índice de concordancia en la puntuación de la tinción del 93.3 % (n = 194) y del 93.8 % (n = 192).

Comparación del instrumento BenchMark XT frente al instrumento BenchMark ULTRA

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado en diferentes centros y con varios lectores para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark XT. El rango clínico del ensayo estaba representado por ciento veinte (120) casos de cáncer de mama negativos en ER y 132 casos positivos en ER, que se asignaron aleatoriamente a los tres centros que llevarían a cabo el estudio, de forma que cada uno de ellos recibiese la misma cantidad de casos y que los casos representasen cada una de las categorías de evaluación clínica. Cada centro se ocupó de realizar la tinción de los casos asignados con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA y en un instrumento BenchMark XT con el anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1). Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, ≥ 1 % de las células tumorales invasivas.¹³

Tabla 8. Anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA y anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark XT.

Instrumento BenchMark XT	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	99	8	107
Negativa	11	91	102
Total	110	99	209
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	99/107	92.5 (85.9-96.2)	
Porcentaje de concordancia negativa	91/102	89.2 (81.7-93.9)	
Porcentaje de concordancia global	190/209	90.9 (86.2-94.1)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 100 % (C.I. del 95 %: 98.5 %-100 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 94.0 % (C.I. del 95 %: 90.4 %-96.4 %) en el del instrumento BenchMark XT. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 94.8% (C.I. del 95 %: 91.4 %-97.0 %) en el caso del instrumento BenchMark ULTRA y del 90.9 % (C.I. del 95 %: 86.7 %-93.8 %) en el del instrumento BenchMark XT.

Comparación del instrumento BenchMark ULTRA frente al instrumento BenchMark ULTRA PLUS

Se llevó a cabo un estudio para comparar el rendimiento de tinción del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS frente al instrumento BenchMark ULTRA. Se tiñeron ciento veinte (120) casos de tejido de carcinoma de mama (54 positivos en ER, 54 casos negativos enER y 12 casos en el

límite de positividad en ER) que reflejaban el rango clínico del ensayo. Los anatomopatólogos evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Los casos se consideraban positivos en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³ Los índices de concordancia entre los casos teñidos con cada instrumento se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA PLUS y anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) en un instrumento BenchMark ULTRA (sin incluir los casos en el límite de la positividad).

Instrumento BenchMark ULTRA PLUS	Instrumento BenchMark ULTRA		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	53	0	53
Negativa	0	53	53
Total	53	53	106
	n/N	% (CI del 95 %)	
Porcentaje de concordancia positiva	53/53	100.0 (93.2-100.0)	
Porcentaje de concordancia negativa	53/53	100.0 (93.2-100.0)	
Porcentaje de concordancia global	106/106	100.0 (96.5-100.0)	

El índice de aceptabilidad de la morfología en todos los portaobjetos con tinción del estudio fue del 99.2% (C.I. del 95 % 95.4%-99.9%) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS. El índice de aceptabilidad del fondo fue del 100.0 % (C.I. del 95 % 96.8%-100.0 %) en el instrumento BenchMark ULTRA PLUS.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Comparativa entre los resultados de pacientes

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, en un solo centro y con lector múltiple, con muestras de 511 casos de cáncer de mama invasivo recogidos en una cohorte clínica de 820 pacientes de cáncer de mama invasivo. Los resultados de la supervivencia libre de progresión se compararon en el caso de las pacientes en las que se había determinado un estado diferente del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) mediante el instrumento BenchMark ULTRA. Se incorporaron en los análisis los casos en los que la paciente contaba con un diagnóstico de carcinoma de mama invasivo confirmado y recibía tratamiento con una intervención quirúrgica primaria, con o sin tratamiento de radioterapia local postoperatorio, seguido por una terapia endocrina adyuvante con tamoxifeno (20 mg por vía oral al día) durante 5 años. Se excluyeron de los análisis los casos en los que no se encontraban disponibles las muestras de tejido de biopsias diagnósticas o de intervenciones quirúrgicas primarias, los casos en los que hubiera un diagnóstico de cáncer previo (salvo de cáncer de piel sin melanoma) o aquellos en los que la paciente hubiera recibido tratamiento de quimioterapia adyuvante o previo. Se realizó la tinción de un total de 1907 núcleos de micromatrices de tejido con tumor primario en el instrumento BenchMark ULTRA. Tres anatomopatólogos independientes evaluaron los portaobjetos con tinción y determinaron el porcentaje de células tumorales teñidas. Un caso se consideraba positivo en ER cuando se observaba tinción del núcleo en, al menos, $\geq 1\%$ de las células tumorales invasivas.¹³

En el estudio se encontraron 441 pacientes con estado positivo en Ventana ER (ER+) y 18 pacientes con estado negativo en Ventana ER (ER-). Un gráfico Kaplan-Meier de supervivencia determinado por el estado del anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) entre la población del análisis primario de supervivencia mostraba una gran diferencia entre los casos Ventana ER+ y ER-. Las pacientes con ER+ experimentaron periodos de supervivencia más prolongados que las pacientes con ER- al administrar un tratamiento de tamoxifeno; la mediana del periodo de supervivencia para las pacientes con ER+ y ER- era de 101.6 y 47.2 meses respectivamente. La prueba de rango logarítmico mostraba que la diferencia en los gráficos de supervivencia era estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

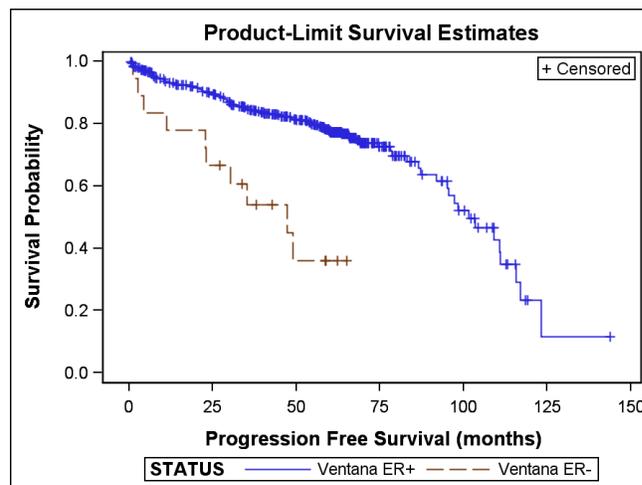


Figura 2. Gráfico Kaplan-Meier de supervivencia por estado Ventana ER.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Si el control positivo presenta una tinción más débil de lo previsto, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes.
2. Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el portaobjetos se ha etiquetado correctamente, compruebe el resto de los controles positivos que se han analizado de forma simultánea para establecer si el problema se debe al anticuerpo primario o a alguno de los reactivos secundarios comunes. Es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
3. Si la tinción de fondo es excesiva, es posible que se observen niveles elevados de biotina endógena. Debería incorporarse un paso de bloqueo de la biotina.
4. Si no se ha eliminado toda la parafina, repita el proceso de desparafinado.
5. Si la tinción de anticuerpo específica es demasiado intensa, repita la sesión reduciendo el tiempo de incubación del anticuerpo primario en intervalos de 4 minutos para obtener la intensidad de tinción deseada.
6. Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
7. Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Procedimiento paso a paso del Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

1. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, et al. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. 2014;90:13-29.
2. Yasar P, Ayaz G, User SD, et al. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*. 2017;16(1):4-20.
3. Tanos T, Rojo L, Echeverria P, et al. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):210.
4. Diep CH, Ahrendt H, Lange CA. Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. *Steroids*. 2016;114:48-58.
5. Carroll JS. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(1):R41-49.
6. Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):444-457.
7. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019.
8. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus

- on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-2223.
9. McGuire WL. Estrogen receptors in human breast cancer. *J Clin Invest.* 1973;52(1):73-77.
 10. Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, et al. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. *Clinical correlation on 547 patients.* *Cancer.* 1986;57(6):1171-1180.
 11. Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, et al. Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. *JCO.* 2006;24(36):5637-5644.
 12. Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(3):229-239.
 13. Hammond ME, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):907-22.
 14. Bae YK, Gong G, Kang J, et al. Hormone Receptor Expression in Invasive Breast Cancer Among Korean Women and Comparison of 3 Antiestrogen Receptor Antibodies - A Multi-institutional Retrospective Study Using Tissue Microarrays. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1817-1825.
 15. Bogina G, Zamboni G, Sapino A, et al. Comparison of Anti-Estrogen Receptor Antibodies Sp1, 6f11, and 1d5 in Breast Cancer: Lower 1d5 Sensitivity but Questionable Clinical Implications. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(5):697-702.
 16. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
 17. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). *Fed. Register.*
 18. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
 19. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances.* Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
 20. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2010.
 21. 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.
 22. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
 23. 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.
 24. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.

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

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

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

Símbolos

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



Número mundial de artículo comercial



Identificador único del dispositivo



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

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
G	Se han actualizado las secciones Advertencias y precauciones y Rendimiento de análisis.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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



Farm. ROBERTA MILLE MAZZA
PRODUTTORES ROCHE S.p.A. e l.
Divisione Diagnostica
DT & APODERATA LEGAL



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: PRODUCTOS ROCHE SA

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 70 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.02.16 15:08:02 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.02.16 15:08:04 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000458-23-3

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente N° 1-0047-3110-000458-23-3

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica) ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: 1) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 2) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1); 3) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2); 4) Pathway anti-Her-2/neu (4B5); 5) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9); 6) CONFIRM TM anti-p53 (DO-7); 7) Anti-p53 (Bp53-11); 8) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1)

Marca comercial: VENTANA.

Modelos:

1) (N°de catálogo Roche: 05278392001, N° de catálogo Ventana: 790-4296) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

- 2) (N°de catálogo: 05278414001, N° de catálogo Ventana: 790-4325) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 3) (N°de catálogo: 05277990001, N° de catálogo Ventana: 790-2223) CONFIRM anti-Progesterone Receptor (PR) (1E2) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 4) (N°de catálogo: 05278368001, N° de catálogo Ventana: 790-2991) Pathway anti-Her-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 5) (N°de catálogo: 05278384001, N° de catálogo Ventana: 790-4286) CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.
- 6) (N°de catálogo: 05278775001, N° de catálogo Ventana: 800-2912) CONFIRM anti-p53 (DO-7) Primary Antibody.
- 7) (N°de catálogo: 05267102001, N° de catálogo Ventana: 760-2542) Anti-p53 (Bp53-11) Primary Antibody.
- 8) (N°de catálogo: 05278406001, N° de catálogo Ventana: 790-4324) CONFIRM anti-Estrogen Receptor (ER) (SP1) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Indicación/es de uso:

1) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

2) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

3) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de la progesterona (PR) en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección VENTANA y sus reactivos auxiliares. El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína receptora de progesterona humana que se encuentra en el núcleo de las células PR neoplásicas y positivas normales.

El anticuerpo CONFIRM anti-PR (1E2) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

4) Anticuerpo monoclonal de conejo destinado a su uso en laboratorio para la detección semicuantitativa del antígeno HER2 en secciones de tejido normal y neoplásico fijado con formol y embebido en parafina con una tinción posterior mediante un instrumento BenchMark IHC/ISH. Está indicado como ayuda para la evaluación de pacientes con cáncer de mama para las que se está planteando la aplicación de un tratamiento con

Herceptin® (trastuzumab) o KADCYLA® (adostrastuzumab emtansina).

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

5) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína Ki-67 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina teñido con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

6) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH. La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

7) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa inmunohistoquímica de la proteína p53 mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina con un instrumento BenchMark IHC/ISH.

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

8) Ensayo destinado a su uso en laboratorio para la detección cualitativa del antígeno receptor de estrógeno (ER) en secciones de tejido mamario fijado con formol y embebido en parafina mediante el módulo de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA con kits de detección y reactivos auxiliares VENTANA.

El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) está dirigido contra un epítipo presente en la proteína alfa ER humana que se encuentra en el núcleo de las células ER neoplásicas y positivas normales. El anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) se recomienda para contribuir al control, el pronóstico y la predicción de las terapias hormonales para tratar el carcinoma de mama.

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

Forma de presentación: 1) a 2) Envases por 250 determinaciones, conteniendo: un dispensador x 25 ml de anticuerpo

3) a 8) Envases por 50 determinaciones, conteniendo: un dispensador x 5 ml de anticuerpo.

Período de vida útil: 1) a 3) y 5) a 8) 24 (VEINTICUATRO) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 - 8 °C.

4) 18 (DIECIOCHO) meses desde la fecha de elaboración conservado entre 2 - 8 °C.

Nombre del fabricante:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.

Lugar de elaboración:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. 1910 East Innovation Park DR. Tucson, AZ USA, 85755.

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 740-852 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

Expediente N° 1-0047-3110-000458-23-3

N° Identificador Trámite: 45722

AM

Digitally signed by PEARSON Enriqueta Maria
Date: 2024.03.01 16:08:44 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2024.03.01 16:08:45 -03:00