



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2020 - Año del General Manuel Belgrano

Disposición

Número:

Referencia: EX-2020-41859033-APN-DGA#ANMAT

VISTO el expediente N° EX-2020-41859033-APN-DGA#ANMAT del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica)** solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto Médico para diagnóstico de uso “in vitro” denominado (N°: **08314373001**) **VENTANA HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail**.

Que en el mencionado expediente consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

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

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

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Decreto N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1°.- 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: (N°: **08314373001**) **VENTANA HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail**, con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente, de acuerdo con lo solicitado por la firma **PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica)**.

ARTICULO 2°.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento N° IF-2020-55729722-APN-DGA#ANMAT.

ARTÍCULO 3°.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM N° **740-670**”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

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

ARTÍCULO 5°.- 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 4°. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.-

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

LABORATORIO: PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica)

NOMBRE COMERCIAL: (N°: 08314373001) VENTANA HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail.

INDICACIÓN DE USO: Ensayo diseñado para determinar el estado del gen HER2 mediante la enumeración de la relación entre el gen HER2 y el cromosoma 17 mediante microscopia de luz. Las sondas HER2 y Chromosome 17 se detectan mediante hibridación in situ bicolor (HSI) en muestras de tejido de carcinoma de mama y gástrico humano fijadas en formol y embebidas en parafina en los instrumentos BenchMark IHC/ISH.

FORMA DE PRESENTACIÓN: Envases por 30 determinaciones, conteniendo 1 vial x 6 ml.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 18 (DIECIOCHO) meses desde la fecha de elaboración conservado a 2-8°C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: VENTANA MEDICAL SYSTEMS, Inc. 1910 E. Innovation Park Dr. Tucson, AZ 85711. (USA) para ROCHE DIAGNOSTICS GmbH. Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim. (ALEMANIA).

EX-2020-41859033-APN-DGA#ANMAT

fd

Digitally signed by GARAY Valeria Teresa
Date: 2021.01.12 16:08:03 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by Gestion Documental
Electronica
Date: 2021.01.12 16:15:47 -03:00



Productos Roche S.A.Q. e I.
División Diagnóstica
Resp.: Roberta Mele Mazza
Mail: roberta.mele_mazza@roche.com
Tel +54 11 5129 8508
Cel: +54 9 11 6803 9560

Agosto 2020

MINISTERIO DE SALUD
A.N.M.A.T
DIRECCIÓN NACIONAL DE PRODUCTOS MÉDICOS
Maria Laura Gentile

Anexo de información: EX-2020-41859033- -APN-DGA#ANMAT

PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. e I. (División Diagnóstica), Legajo N° 740, con domicilio en Otto Krause 4211 – Tortuguitas - Malvinas Argentinas – Provincia de Buenos Aires, representada por su Co-Directora Técnica y Apoderada legal.

Se adjunta:

- IFGRA (rótulos y manual de instrucciones)

Sin más, y a la pronta respuesta

Saluda a Ud. muy atte.,

PROYECTO DE ROTULO

Catálogo N° 08314373001 – VENTANA HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail:

Rótulos externos:

 **VENTANA®**
**VENTANA HER2
Dual ISH DNA
Probe Cocktail**
6 mL (~14.24 µg/mL)

REF 800-6043
GTIN 07613336158425
LOT A99999

 2099-11-15 
 2099-11-15 

(240) 08314373001 -Roche #

 Rx Only  30
2°C  8°C


800-6043A99999 0001

Rótulo interno

 **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim, Germany

 **VENTANA®**
**VENTANA HER2
Dual ISH DNA
Probe Cocktail**
6 mL (~14.24 µg/mL)

   800-6043
 A12345  30
 2015-12-28  8°C
 07613336158425 2°C 

Foto del producto:





Sobre-rótulo local

Directora Técnica: Vanesa Diambra - Farmacéutica

Autorizado por la A.N.M.A.T. PM-740-670

Establecimiento importador:

Productos Roche S.A.Q. e I. (División Diagnóstica).


Otto Krause 4211, Tortuguitas,

Malvinas Argentinas, Bs As, Argentina.

Uso profesional exclusivo

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043
08314373001

IVD  30

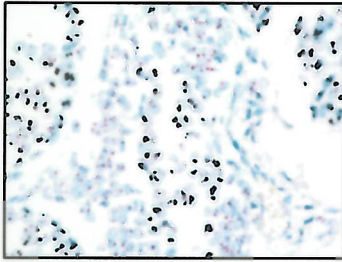


Figura 1. Estado HER2 amplificado con el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, Carcinoma de mama.

USO PREVISTO

El objetivo de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail es determinar el estado del gen *HER2* mediante la enumeración de la relación entre el gen *HER2* y el cromosoma 17 mediante microscopía de luz. Las sondas *HER2* y Chromosome 17 se detectan mediante hibridación *in situ* bicolor (HSI) en muestras de tejido de carcinoma de mama y gástrico humano fijadas con formol y embebidas en parafina, incluida la unión gastroesofágica, tras la tinción de los instrumentos BenchMark IHC/ISH.

El VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail está indicado como ayuda en la evaluación de pacientes para quienes se contempla el tratamiento con Herceptin (trastuzumab). Este producto debe ser interpretado por un patólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados. Este producto es para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El *HER2/neu* (*HER2*) pertenece a una familia de cuatro receptores transmembrana de tirosina cinasa que intervienen en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células.^{1,2} El gen *HER2* codifica la proteína *HER2*,^{2,3} y se produce la sobreexpresión de la proteína *HER2*, la amplificación del gen *HER2*, o ambas, en aproximadamente del 15 al 25 % de los carcinomas de mama y se asocian a un comportamiento agresivo del tumor.^{4,5} El VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contiene sondas *HER2* (marcadas con el dinitrofenilo de hapteno o DNP) y sondas Chromosome 17 (marcadas con el hapteno digoxigenina o DIG) formuladas en un tampón con formamida. Las sondas están diseñadas para detectar la amplificación del gen *HER2* en los carcinomas de mama y los carcinomas gástricos. La sonda *HER2* DNA es una mezcla de sondas oligo que tiene como objetivo el gen *HER2* (también conocido como *ERBB2* y *NEU*), localizado en el cromosoma 17 humano (17q12). La sonda Chromosome 17 es una mezcla de sonda oligo que abarca las secuencias de la región centromérica y sirve como referencia para la aneusomía. La cantidad de copias de ambas sondas se enumeran en los núcleos de las células tumorales y los resultados se comunican en forma de relación *HER2*/Cromosoma 17 para determinar el estado de amplificación de *HER2* (cuando la relación *HER2*/Cromosoma 17 $\geq 2,0$ está amplificado, mientras que si la relación es $< 2,0$ no está amplificado).

En muchos estudios clínicos se ha demostrado que la amplificación o la sobreexpresión de *HER2* están asociadas a un pronóstico clínico pobre en pacientes con cáncer de mama invasivo y correlacionadas con varias variables de pronóstico negativo, que incluyen el estado negativo del receptor de estrógenos (ER), fracción de fase S elevada, estado nodal positivo, p53 mutado y grado nuclear elevado.^{6,7} En varios estudios, las pacientes con cáncer de mama (tanto con nodos positivos como con negativos) con una amplificación del estado del gen *HER2* mostraron un descenso en la supervivencia global y una mayor frecuencia de recurrencia.^{1,8-11} Los resultados de los estudios clínicos en los que se midió la sobreexpresión de la proteína *HER2* mediante inmunohistoquímica fueron similares a los obtenidos mediante la amplificación del gen *HER2*.^{9,11-13} El conocimiento del estado del gen *HER2* y/o el estado de la proteína en pacientes con cáncer de mama invasivo permite a los médicos tomar decisiones con más información a fin de mejorar el tratamiento global de estas pacientes.

El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el dominio extracelular de *HER2* que ha demostrado sus beneficios en pacientes con cáncer de mama positivo en *HER2*.¹⁴⁻¹⁹ La demostración de la amplificación del gen *HER2* y/o la

sobreexpresión de la proteína es esencial para la selección de pacientes a tratar con trastuzumab. Estudios clínicos han mostrado que las pacientes con cáncer de mama y elevada sobreexpresión de la proteína del gen *HER2* y/o amplificación del gen se benefician más del trastuzumab.²⁰ Es necesario determinar la amplificación del gen *HER2* y/o la sobreexpresión de la proteína para las pacientes afectadas de cáncer de mama invasor a las que se proyecta tratar con trastuzumab. Se han encontrado hallazgos similares en estudios clínicos sobre carcinoma gástrico.²¹ La terapia con trastuzumab está clínicamente indicada para pacientes con sobreexpresión o amplificación del *HER2*.

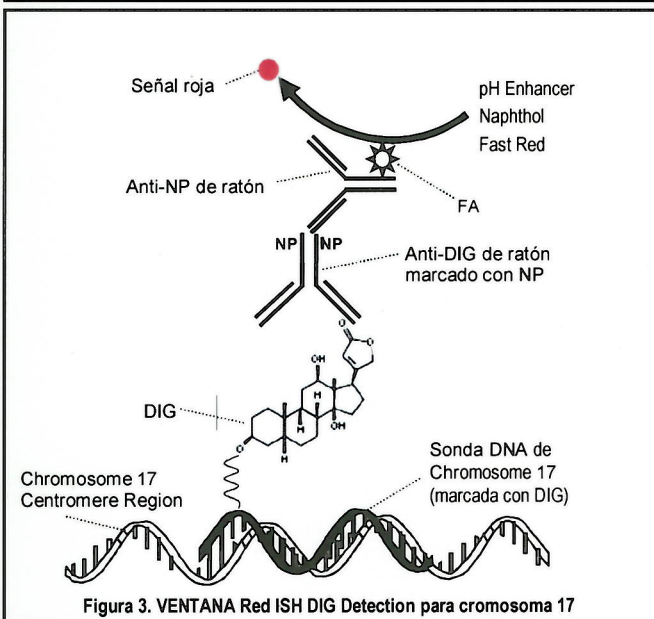
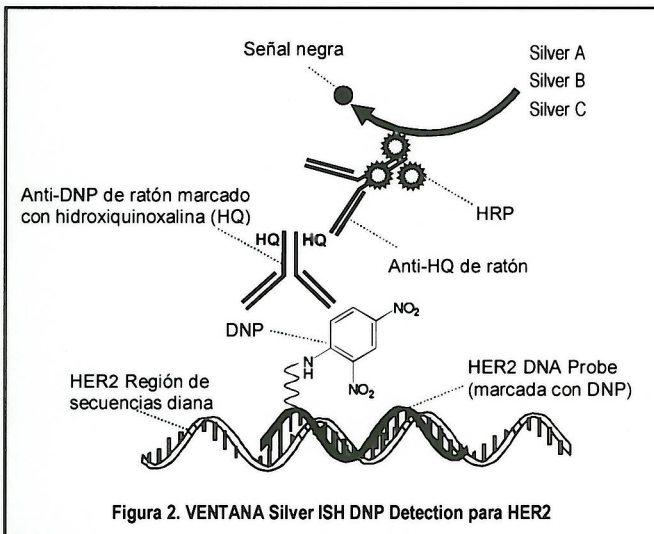
PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail está óptimamente formulado para su uso con VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit, y reactivos accesorios en un instrumento BenchMark IHC/ISH.

El kit de detección contiene un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado con enzimas conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP) que se utiliza como enzima cromogénica. Durante el proceso de tinción de la hibridación *in situ* doble (Dual ISH), las sondas de DNP y DIG se cohibridan con sus respectivas secuencias diana de ADN en los núcleos celulares. La detección de la sonda *HER2* marcada con DNP se realiza en primer lugar, utilizando el VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit que contiene los siguientes dispensadores: anticuerpo primario anti-DNP de ratón marcado con hidroxiquinoxalina (HQ), anticuerpo secundario anti-HQ de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico (HRP), Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) y Chromogen C (Silver C). Después de la incubación con un anticuerpo primario anti-DNP de ratón marcado con hidroxiquinoxalina (HQ) y un conjugado de ratón anti-HQ HRP secundario, se produce la reacción SISH. Esta reacción puede describirse brevemente como un resultado de la adición secuencial de Chromogens A (acetato de plata), B (hidroquinona) y C (H₂O₂). Aquí, la hidroquinona reduce los iones de plata (Ag⁺) a átomos de plata metálicos (Ag⁰). Esta reacción está impulsada por el sustrato para HRP, peróxido de hidrógeno (Chromogen C). El precipitado de plata se deposita en los núcleos y una copia individual del gen *HER2* se visualiza en forma de punto negro. En la figura 2 se ilustra la reacción de SISH.

Tras la detección SISH del *HER2*, la sonda Chromosome 17 marcada con DIG se detecta por medio del VENTANA Red ISH DIG Detection kit. Este kit incluye los siguientes dispensadores: anticuerpo primario anti-DIG de ratón etiquetado con nitropirazole (NP), anticuerpo secundario anti-NP de ratón conjugado con Alkaline Phosphatase (AP), pH Enhancer, Naphthol y Fast Red. Después del desarrollo de la señal de SISH, se incuban los portaobjetos con el anticuerpo primario anti-DIG de ratón marcado con NP, que se une al hapteno DIG de la sonda Chromosome 17. El anticuerpo primario anti-hapteno se detecta con el anti-NP de ratón conjugado con la enzima AP. El portaobjetos se incuban con la solución del pH Enhancer, que proporciona las concentraciones y los componentes salinos adecuados, junto con pH tamponado, para que el comportamiento de la enzima AP sea óptimo. A continuación se aplica el fosfato de naftol, que se utiliza como el sustrato de la enzima FA (la FA desfosforila el naftol), Fast Red, que se añade a continuación al portaobjetos, se combina con el naftol desfosforilado para formar un precipitado rojo, que se visualiza fácilmente mediante microscopía óptica. En la figura 3 se ilustra la reacción de Red ISH. Después se realiza la contratinción de la muestra con Hematoxylin II para la interpretación mediante microscopía óptica.

El protocolo de tinción se compone de numerosos pasos en los que se incuban reactivos durante un periodo de tiempo predeterminado a una temperatura específica. Al final de cada etapa de incubación, el instrumento BenchMark IHC/ISH lava las secciones para eliminar el material no adherido y aplica un cubreobjetos líquido que minimiza la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico con objetivos de 20x, 40x y/o 60x.



REACTIVOS SUMINISTRADOS

El dispensador VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contiene reactivo suficiente para 30 pruebas.

Un dispensador VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail de 6 ml contiene aproximadamente 14 µg/ml de las sondas HER2 marcadas con dinitrofenilo (DNP) y 0,24 µg/ml de las sondas Chromosome 17 marcadas con digoxigenina (DIG) formuladas en un tampón de hibridación con base de formamida. Ambas sondas se utilizan para determinar el estado del gen *HER2* (es decir, la proporción *HER2* / Chromosome 17).

RECONSTITUCIÓN, MEZCLA, DILUCIÓN Y TITULACIÓN

El VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se ha optimizado para su uso con instrumentos BenchMark IHC/ISH. No se requiere reconstitución, mezcla, dilución ni titulación de la sonda.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No se suministran reactivos de tinción, como kits de detección y componentes auxiliares de VENTANA.

No todos los productos enumerados en el prospecto están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local.

Los siguientes reactivos y materiales son necesarios para la tinción, pero no se suministran:

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (N.º de cat. 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (N.º de cat. 760-512 / 08318832001)
3. HybReady Solution (N.º de cat. 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (N.º de cat. 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (N.º de cat. 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (N.º de cat. 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (N.º de cat. 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (N.º de cat. 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (N.º de cat. 950-102 / 05279771001)
10. *ultraView* Silver Wash II (Pre-dilute) (N.º de cat. 780-003 / 05446724001)
11. Reactivos a granel específicos para instrumentos BenchMark GX y XT:
 - Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Pre-dilute) (N.º de cat. 950-124 / 05279801001)
 - Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Pre-dilute) (N.º de cat. 950-123 / 05279798001)
 - Liquid Coverslip (LCS) (Pre-dilute) (N.º de cat. 650-010 / 05264839001)
12. Reactivos a granel específicos para el instrumento BenchMark ULTRA:
 - ULTRA CC1 (Pre-dilute) (N.º de cat. 950-224 / 05424569001)
 - ULTRA CC2 (Pre-dilute) (N.º de cat. 950-223 / 05424542001)
 - ULTRA LCS (Pre-dilute) (N.º de cat. 650-210 / 05424534001)
13. Instrumento BenchMark IHC/ISH
14. Etiquetas con códigos de barras
15. Portaobjetos para microscopio con carga positiva (Superfrost Plus o equivalente)
16. Xileno (calidad histológica)
17. Agua desionizada o destilada
18. Medio de montaje permanente**
19. Cobertura suficiente para cubrir el tejido
20. Cubreobjetos automático (como el aplicador de cubreobjetos automático Tissue-Tek SCA)
21. Cubetas o baños de tinción
22. Horno capaz de mantener 60 °C
23. Cronómetro
24. Microscopio óptico con objetivos de 20x, 40x y/o 60x
25. Lavavajillas suave
26. HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (N.º de cat. 783-4422 / 05640300001) se puede utilizar para la resolución de problemas, según sea necesario.

**Véanse en la Tabla 24 los medios de montaje compatibles con este ensayo.

CONSERVACIÓN

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

Para garantizar el adecuado suministro y la estabilidad de la sonda, después de cada uso coloque nuevamente el tapón del dispensador y coloque inmediatamente el dispensador en el refrigerador en posición vertical.

Todos los dispensadores de sonda 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

Cuando se utiliza el procedimiento habitual, los tejidos fijados con formol y embebidos en parafina (FFPE) resultan adecuados para el uso con esta sonda cuando se utilizan con un instrumento BenchMark IHC/ISH. El fijador tisular recomendado es formol tamponado neutro al 10 % (NBF) durante un periodo máximo de 6 a 72 horas²². Aparte de los ensayos VENTANA, ciertos estudios recientes han comprobado que la mayoría de los resultados inconcluyentes del gen *HER2* obtenidos con FISH están asociados a factores preanalíticos como la fijación insuficiente y excesiva,²³ así como un retraso en la

fijación.²⁴ La aplicación estricta de los procedimientos de fijación (por ejemplo, el uso de un procesador dedicado para garantizar una fijación mínima de seis horas) redujo en un 68,5 % los casos inconcluyentes, que pasaron de un 10,8 % de fallos a un 3,4 %. Las muestras fijadas en formol durante menos de seis horas pueden dar como resultado una pérdida de señal y sobredigestión nuclear, observable por una tinción pálida/débil de la hematoxilina. Solo se recomienda la fijación en un 10 % de NBF, ya que algunos fijadores producen tinciones variables con ensayos basados en ISH (incluyendo Bouin's y alcohol-formol-ácido acético (AFA)).²¹

Los portaobjetos deberán teñirse inmediatamente, ya que la calidad de las dianas de ácido nucleico de los cortes de tejido puede disminuir con el tiempo. Estudios internos han demostrado que los portaobjetos de mama y corte gástrico almacenados a 2-8 °C pueden ser estables durante 12 meses. Los portaobjetos cargados positivamente pueden ser sensibles a tensiones ambientales que ocasionen una tinción inapropiada de cualquier ensayo de ISH (por ejemplo, falta de tinción o contratinción en el tejido). Solicite a su representante de Roche una copia de "Impacto de las tensiones ambientales sobre distintos tipos de portaobjetos de histología" para comprender mejor cómo utilizar estos tipos de portaobjetos.

Cada sección debe cortarse con el grosor adecuado (4 µm) para el ensayo que se está utilizando y debe colocarse en portaobjetos de microscopio con carga positiva (Superfrost Plus o equivalente). Los portaobjetos deben drenarse o secarse para eliminar el exceso de agua entre el portaobjetos y el tejido.

Es posible que los cortes de grosor superior a 4 µm necesiten un tratamiento con proteasa más fuerte que la condición recomendada y es posible que se produzca más burbujeo nuclear que en los cortes finos debido al exceso de parafina en el tejido. El burbujeo nuclear se manifiesta en forma de burbujas grandes o pequeñas, o vacuolas en el núcleo. Cuando se produce el burbujeo nuclear suele aparecer un espectro de efectos en las señales SISH y Red ISH, que se caracterizan por (1) núcleos con burbujas nucleares en las cuales las señales SISH y Red ISH siguen por lo general centradas en el núcleo; y (2) núcleos con burbujas nucleares que empujan las señales SISH y Red ISH hacia la periferia. A menudo en ambos supuestos, si las señales SISH y Red ISH se distinguen claramente, carecen de distorsiones y siguen siendo enumerables, el caso puede puntuarse. No obstante, a veces un burbujeo nuclear intenso puede distorsionar las señales SISH y Red ISH o impedir su discernimiento, con lo cual no es posible una enumeración exacta. Este fenómeno es más frecuente cuando las señales SISH y Red ISH se empujan hacia la periferia nuclear. Cuando esto ocurre, a menudo se encuentran núcleos enumerables en otros lugares de la muestra y el caso puede puntuarse. Si la intensidad del burbujeo nuclear impide localizar una cantidad suficiente de núcleos en los que puedan enumerarse las señales SISH y Red ISH sin posibilidad de error, el caso en cuestión no deberá enumerarse. El burbujeo nuclear también puede ocurrir en un contexto de infrafijación (de una a tres horas con formol), que es un burbujeo nuclear menos discreto. Esta situación puede remediarse en la fijación a tres horas cambiando el tratamiento de proteasa y acondicionamiento celular, pero es probable que a una hora no tenga solución.

El ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail incorpora opciones de pretratamiento adicionales que pueden ayudar a optimizar el ensayo en laboratorios diferentes y permitir la posterior resolución de problemas planteados por tejidos o portaobjetos que muestren una tinción subóptima. Ventana Medical Systems, Inc. ("Ventana") recomienda que cada laboratorio efectúe análisis iniciales con muestras de control representativas, preparadas en exactamente las mismas condiciones que las muestras clínicas a analizar. De esta manera, se podrán optimizar las condiciones de tinción específicas de los diferentes laboratorios, que pueden presentar variaciones en los procedimientos exactos de preparación de las muestras. Los resultados pueden variar con factores previos al análisis diferentes a los recomendados. Las muestras que tienen una preparación previa al análisis bajo condiciones no recomendadas por Ventana pueden tener una tinción inadecuada en el ensayo.

AVISOS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* (DIV).
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. **Advertencia: el producto contiene formamida.** La formamida es tóxica por inhalación y moderadamente tóxica por ingestión. Es irritante para la piel, los ojos y las membranas mucosas, y es absorbida por la piel. Puede causar daños al feto. Tome precauciones al manipular los reactivos. Utilice guantes desechables y lleve ropa de protección adecuada cuando maneje materiales posiblemente tóxicos o cancerígenos.

5. Asegúrese de que el contenedor de residuos esté vacío antes de comenzar un ciclo en el instrumento. Si no se toma esta precaución, el recipiente de residuos puede desbordarse y el usuario corre el riesgo de sufrir resbalones y caídas. En los instrumentos BenchMark XT y GX, no se iniciará un análisis sin vaciar el contenedor de residuos.
6. Los materiales de origen humano o animal deben tratarse como posible riesgo biológico y desecharse con las debidas precauciones.
7. Evite el contacto de reactivos con los ojos, la piel y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante. Evite la inhalación de reactivos.
8. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, puesto que ello podría dar lugar a resultados incorrectos.
9. Consulte a las autoridades locales o nacionales para determinar el método de eliminación recomendado.
10. Para obtener información de seguridad complementaria, consulte la hoja de datos de seguridad del producto y la guía de símbolos y peligros que encontrará en la página www.ventana.com.

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN

Las sondas de VENTANA se han desarrollado para su uso en un instrumento BenchMark IHC/ISH junto con los kits de detección y los accesorios de VENTANA. Los procedimientos de tinción para el instrumento BenchMark IHC/ISH con el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y el VENTANA Red ISH DIG Detection Kit se enumeran en la Tabla 1. Los protocolos de tinción recomendados se indican en la Tabla 2.

Los parámetros para los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el manual del usuario del equipo.

Tabla 1. Utilice los siguientes procedimientos de tinción para realizar el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en los instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Plataforma del instrumento	Procedimiento de tinción
BenchMark GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark ULTRA	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

Tabla 2. Condiciones de tinción recomendadas para el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en instrumentos BenchMark IHC/ISH.

Condición de la tinción	Mama	Gástrico
Horneado	No seleccionado	No seleccionado
Cell Conditioning 1	16 min.	16 min.
Cell Conditioning 2	24 min.	16 min.
ISH Protease 3	20 min.	16 min.
Temperatura de lavado de astringencia	76 °C para los instrumentos BenchMark GX/XT	76 °C para los instrumentos BenchMark GX/XT
	74 °C para el instrumento BenchMark ULTRA	74 °C para el instrumento BenchMark ULTRA

Debido a la variación en la fijación y el procesamiento de tejidos, así como las condiciones generales del entorno y el instrumento de laboratorio, puede ser sea necesario aumentar o reducir el acondicionamiento celular o el pretratamiento con proteasa en función de las muestras individuales.

Inicio de un análisis en los instrumentos BenchMark IHC/ISH

1. Aplique la etiqueta del código de barras del portaobjetos que corresponda al protocolo de sonda que se va a llevar a cabo.
2. Cargue los reactivos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail de VENTANA Red ISH DIG y VENTANA Silver ISH DNP Detection Kits y los reactivos auxiliares necesarios en la(s) bandeja(s) de reactivos o en el carrusel. Coloque la(s) bandeja(s) de reactivos o el carrusel en el instrumento.

3. Compruebe los líquidos a granel y los residuos.
4. Los frascos de tampón de reacción deben estar llenos.
5. El recipiente de residuos debe estar vacío antes del inicio de la serie.
6. Cargue portaobjetos en el instrumento.
7. Comience la sesión de tinción.
8. Cuando finalice el análisis, saque los portaobjetos del instrumento. Los portaobjetos teñidos conservarán residuos de solución cubreobjetos líquida y tampón. Proceda con el enjuague y la deshidratación (vea las instrucciones que siguen).

Procedimiento de deshidratación

Nota: El cromógeno Fast Red es soluble en alcohol y acetona. Si los portas teñidos se exponen a alcohol y/o acetona, esto puede dar como resultado una pérdida de la señal específica.

1. Para eliminar la solución cubreobjetos líquida, lave los portaobjetos en 2 soluciones secuenciales de un lavavajillas suave (no utilice detergente para lavavajillas automáticos).
2. Enjuague bien los portaobjetos con agua destilada durante aproximadamente 1 minuto. Sacuda el exceso de agua.
3. Coloque los portaobjetos en un horno (45-60 °C) para secarlos o déjelos secar a temperatura ambiente. En un horno, los tiempos de secado oscilan entre 10 minutos y una hora (el secado de portaobjetos teñidos durante periodos más largos no parece afectar los resultados de la tinción). Compruebe que los portaobjetos estén completamente secos antes de colocarlos los cubreobjetos, porque la presencia de agua en los primeros puede dificultar la colocación de los segundos y hacer que se formen burbujas.
4. Transfiera los portaobjetos a un baño de xileno durante aproximadamente 30 segundos.
5. Coloque los medios de montaje en el portaobjetos.
6. Coloque el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Tenga en cuenta que algunos medios de montaje son incompatibles con este ensayo y no deben utilizarse (consulte las secciones Limitaciones y Resolución de problemas).

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Muestra de control positivo

Las señales normales del *HER2* y del cromosoma 17 (1 a 2 copias por célula) actúan como controles positivos internos y deben ser visibles en la muestra utilizando objetivos 20x, 40x y/o 60x. Sin embargo, debido a la heterogeneidad biológica, no todas las células presentarán una copia de gen individual. La tinción nuclear específica puede localizarse en diversas células: fibroblastos estromales, células endoteliales, linfocitos y células epiteliales no neoplásicas. Si los controles positivos no muestran una tinción positiva, esto puede indicar un problema con el reactivo o el instrumento. Como cada muestra tiene un control interno positivo (es decir, una tinción SISH adecuada en células normales), esto actúa como el verdadero "control positivo".

Se debe utilizar un control de muestras positivo específico del laboratorio con cada procedimiento de tinción realizado. Las muestras de control pueden ser ejemplares preparados exactamente igual que las muestras de pacientes. Estos controles son útiles para supervisar todas las etapas del procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta el proceso de tinción. El uso de una muestra preparada de manera diferente a las muestras en estudio aportará un control para los reactivos, el instrumento y los procedimientos, pero no para la fijación y el procesamiento de las muestras. Los resultados con las muestras de prueba se deben analizar en el mismo ciclo.

Muestra de xenoinjerto

Los portaobjetos de xenoinjerto pueden resultar útiles para realizar una validación preliminar del método utilizado para la tinción de portaobjetos con el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. También se recomiendan como ayuda para la resolución de problemas, cuando se utilizan en análisis que contienen muestras clínicas. Para más información, consulte el prospecto de portaobjetos de xenoinjerto.

Discrepancias no explicadas

Las discrepancias no explicadas en los controles deben comunicarse al representante local inmediatamente. Si los resultados del control de calidad no cumplen con las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Consulte la sección Solución de problemas de este prospecto. Identifique y corrija el problema y, a continuación, repita las muestras del paciente.

Verificación del ensayo

Antes del uso inicial de una sonda o un sistema de tinción en un procedimiento de diagnóstico, se debe verificar la especificidad de la sonda probándola en una serie de tejidos con características de rendimiento de ISH conocidas (consulte el prospecto de la sonda y las recomendaciones de control de calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program Anatomic Pathology Checklist,²⁵ o las CLSI Approved Guideline²⁶ o ambos documentos). Estos procedimientos de control de calidad deben repetirse para cada nuevo lote o reactivo, o cuando ocurra un cambio en los parámetros del ensayo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El patrón de tinción celular para el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail es nuclear.

Un patólogo con experiencia en la interpretación microscópica de muestras de anatomía patológica, los procedimientos de ISH y el reconocimiento de copias de *HER2* y cromosoma 17 (Chr17) individuales y amplificadas (que requieren el examen microscópico con objetivos 20x, 40x o 60x) debe evaluar los controles antes de interpretar los resultados.

Nota: no se recomienda el uso de un objetivo 100x. Todas las lecturas de los portaobjetos del tejido realizadas durante las pruebas de verificación y validación se realizaron con objetivos de 20x, 40x y/o 60x.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail debe utilizarse junto con la *Interpretation Guide VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail* [N/P 1018386] para la evaluación del portaobjetos.

En las secciones siguientes se describe cómo interpretar y calificar los portaobjetos. La Tabla 3 ilustra cómo contar señales discretas.

Definiciones

1. Estado del gen *HER2*. El estado del gen *HER2* es una función de la relación entre el número de copias del gen *HER2* y el número de copias del Chr 17 por célula en un carcinoma de mama o gástrico invasivo. El estado del gen *HER2* se clasifica usando las siguientes directrices:
 - a. La proporción $HER2/Chr17 \geq 2,0$ se ha amplificado
 - b. La proporción $HER2/Chr17 < 2,0$ no se ha amplificado
2. Adecuación de los portaobjetos. Un portaobjetos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail debe cumplir tres criterios para que se considere adecuado para su enumeración; si el portaobjetos no cumple con estos criterios, entonces no se pueden enumerar y el resultado no es satisfactorio.
3. Control positivo interno. Las señales normales de *HER2* y Chr17 (de 1 a 2 copias por célula) actúan como controles internos positivos y deben ser visibles en la muestra. Esta tinción nuclear puede localizarse en diversas células no neoplásicas: fibroblastos estromales, células endoteliales, linfocitos y células epiteliales no neoplásicas.
4. Células neoplásicas. Utilizando objetivos de 20x, 40x y/o 60x, el aspecto invasivo del tumor debe presentar un campo enumerable de señales SISH y Red ISH.
5. Fondo. Cualquier tinción de fondo resultante de sistemas para detección de SISH o de Red ISH necesitará evaluarse a fin de determinar si afecta a la enumeración de las señales SISH o Red ISH específicas. El fondo de SISH suele aparecer en forma de "polvo" SISH distinguible de la señal específica. El fondo rojo puede aparecer como una neblina roja u, ocasionalmente, señales no específicas de menor intensidad que la señal específica.
6. Áreas objetivo para la enumeración de señales. Un área de estudio aceptable, dentro de un carcinoma invasivo, muestra un campo enumerable de señales SISH y Red ISH. La enumeración de señales no debe realizarse en áreas que contengan señales SISH o Red ISH débiles, núcleos comprimidos o superpuestos, o necrosis. Si un área diana se considera inadecuada para la enumeración, a menudo es posible encontrar otras áreas diana adecuadas en el mismo portaobjetos. Esto se puede determinar por la presencia de células normales que presentan una tinción SISH y Red ISH adecuada en el área de estudio o en su cercanía.

Observaciones adicionales sobre *HER2* y cromosoma 17

Otras observaciones pueden anotarse como comentarios en el informe del anatomopatólogo.

1. Heterogeneidad: En ocasiones, el tejido puede contener áreas de carcinoma que son genéticamente heterogéneas en cuanto al número de copias de *HER2* (es decir, puede haber una mezcla de núcleos sin amplificar y amplificadas, o bien una mezcla de núcleos que contengan copias diversas de *HER2*). Esta particularidad puede observarse entre células del carcinoma contenidas en la misma área diana, o entre dos áreas diana diferentes.

- La aneuploidía es cualquier trastorno mediante el cual un organismo tiene más o menos cromosomas específicos de lo normal; dicho de otro modo, el número de ejemplares de un cromosoma determinado (en este caso, el Chromosome 17) no es diploide. En la polisomía puede haber tres o más copias del cromosoma, en lugar de las dos previstas. En la monosomía, las células tumorales pueden presentar solo una copia del Chromosome 17. Se han descrito "amplificaciones", cúmulos o polisomías aparentes del cromosoma 17 (con o sin cúmulos de *HER2* SISH).²⁷ En los casos que presenten cúmulos de *HER2* y cromosoma 17, deberá procederse con cuidado para no considerarlos con una proporción de ~1,0. En estos casos, el lector deberá consultar la IHC para los análisis de sobreexpresión de la proteína *HER2*, porque en su mayoría tienden a ser 3+.
- Deleción monoalélica: La eliminación del gen *HER2* del Chromosome 17 en las células tumorales da lugar a una proporción *HER2*/Chr17 < 1,0.

Visualización de las señales

Las señales SISH y Red ISH se visualizan como:

- Copia única. Un punto negro discreto (SISH) se cuenta como una sola copia de *HER2*. Los puntos únicos discretos visualizados en los núcleos internos de control (no neoplásicos) representan el tamaño de una copia única en las células de carcinoma invasivo para la señal SISH (negra). En las señales Red ISH, cada señal discreta se cuenta como una sola copia. Debe tenerse en cuenta que la señal Red ISH del Chr17 puede parecer más grande que las señales SISH y, a veces, de forma alargada. Si se observa una neblina rosa, no debe confundirse con una señal. No deberán enumerarse las señales rojas de color muy claro en comparación con la señal presente en los núcleos de control interno positivo y en el patrón general de la tinción, porque pueden ser inespecíficas. Las señales rojas específicas tienen bordes discretos, como se muestra en la Tabla 3.
- Copias múltiples. Las señales SISH individuales discretas visualizadas en los núcleos de control interno positivo representan el tamaño del *HER2* de una sola copia en células de carcinoma invasivo. El tamaño de las señales SISH individuales se utiliza como referencia para determinar el número relativo de copias amplificadas en los núcleos del cáncer. En las señales Red ISH, cada señal discreta se cuenta como una sola copia.
- Cúmulos. Presencia de múltiples señales superpuestas en los núcleos que no se pueden enumerar. Un cúmulo es un conjunto de numerosas señales SISH superpuestas en los núcleos, que no pueden discernirse individualmente. Solamente el lector puede calcular los cúmulos de *HER2*. Por ejemplo, puede calcularse que un cúmulo grande de varias señales SISH contiene 12 copias, y que otros cúmulos menores tienen seis. El cálculo se efectúa utilizando como referencia las copias SISH individuales presentes en las células de control interno positivo. La presencia de cúmulos *HER2* se indica en la hoja de puntuación.
- Los núcleos superpuestos, los núcleos con un solo color y las muestras con tinción inespecífica no deben enumerarse. Los núcleos con señales Red ISH y SISH superpuestas que no puedan distinguirse deben visualizarse con aumentos mayores para distinguir las dos señales, o de lo contrario no deben contarse. Los núcleos que presenten burbujas no se deben contar.

Enumeración de las señales de SISH y Red ISH para determinar el estado del gen *HER2*

Examine el portaobjetos teñido con H&E para localizar áreas que contengan carcinoma invasor de mama o gástrico. Examine el portaobjetos teñido con *HER2* Dual ISH correspondiente al H&E e identifique un área de estudio con carcinoma invasor de mama o gástrico. Antes de enumerar las señales de *HER2* y cromosoma 17 para determinar el estado del gen *HER2*, es imprescindible comprobar si el área de estudio invasiva (el tejido de la lesión) se ha teñido correctamente y satisface los criterios de adecuación de los portaobjetos (véase la sección de Definiciones anterior, 2. Adecuación de los portaobjetos).

Ventana ha creado un algoritmo de puntuación para el ensayo que maximiza la precisión y eficiencia del recuento. Deberán enumerarse 20 núcleos, cada uno de ellos con señales rojas (Red ISH) y negras (SISH).




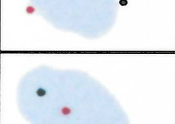
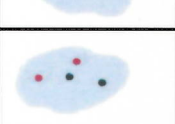
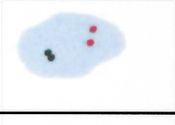



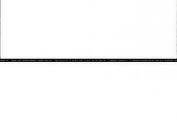
Criterios de la selección celular

Cuente solo núcleos con diámetros representativos de la población media de núcleos de carcinoma invasivo en el área de estudio. No cuente señales presentes en núcleos:

- Mucho mayores en diámetro que el tamaño medio de los núcleos de carcinoma
 - Mucho menores en diámetro que el tamaño medio de los núcleos de carcinoma
- Cuente solo los núcleos representativos de la población de núcleos de carcinoma invasor con el mayor número promedio de señales (tanto SISH como Red ISH).

En áreas de estudio genéticamente heterogéneas para el número de copias de *HER2*, cuente solo núcleos representativos de la población de núcleos de carcinoma invasor con el máximo número promedio de señales (tanto SISH como Red ISH). Observe que la heterogeneidad está presente en la hoja de puntuación.

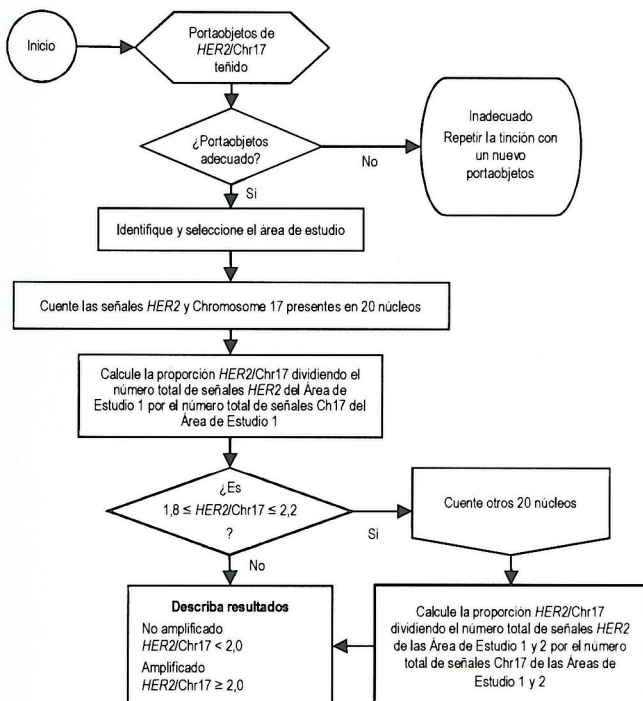
Tabla 3. Visualización de las señales.

	No cuente los núcleos si están superpuestos.
	No cuente si no hay señal presente.
	No los cuente si únicamente hay una señal de un solo color.
	No los cuente si las señales están fuera de los núcleos.
	Cuente como una señal negra (<i>HER2</i>) y una roja (Chr17).
	Cuente como dos señales negras (<i>HER2</i>) y dos rojas (Chr17).
	Cuente como una señal negra (<i>HER2</i>) y dos rojas (Chr17). La señal negra es un «doblete». Cuente dos señales adyacentes del mismo color únicamente si la distancia entre ellas es igual o superior al diámetro de una señal individual.
	Los grupos SISH pequeños solo pueden calcularse utilizando el tamaño de una sola señal como referencia. Utilice las células estromáticas para calcular el tamaño de la señal (célula menor). Por ejemplo, este cúmulo podría calcularse como seis señales SISH; añadiendo las otras dos señales individuales, se obtiene un total de ocho. Se cuenta como dos señales rojas. Anote en la hoja de puntuaciones que hay cúmulos presentes para <i>HER2</i> .
	Calcule el cúmulo grande. Aquí, el cúmulo podría estimarse como doce señales negras; añadiendo las otras cuatro señales individuales, se obtiene un total de 16. Cuente las señales rojas como 2 copias del Chr17. Anote en la hoja de puntuaciones que hay cúmulos presentes para <i>HER2</i> .
	Una señal roja cerca de una señal negra debe contarse como una señal roja y una señal negra. Esto puede requerir la enumeración por medio de un objetivo de 60x para poder distinguirlos. Así, cuente como una señal negra (<i>HER2</i>) y dos rojas (Chr17). Si las señales superpuestas no se pueden distinguir, no cuente ese núcleo.

	Grupo de puntos negros que oscurecen la(s) señal(es) roja(s). Se puede utilizar un mayor índice de aumento (60x) para tratar de confirmar la presencia o ausencia de señal(es) roja(s); de lo contrario, no se cuentan: se deben contar siempre núcleos con señales evidentes rojas. Anote en la hoja de puntuaciones la presencia de cúmulos SISH. Los núcleos con números visibles y más altos de señales rojas deben contabilizarse en los núcleos con grupos SISH.
	Cuando haya "polvo" SISH de fondo en los núcleos, cuente solamente si las señales SISH específicas se distinguen claramente del fondo.
	Si se observa una neblina rosa, no debe confundirse con una señal. Se pueden ver señales Red ISH pequeñas y tenues que podrían representar la unión inespecífica de la sonda Chr17 a otros cromosomas. La imagen muestra dos señales rojas (Chr17) discretas y dos señales negras (HER2).

Estado del gen HER2: Algoritmo de puntuación para el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

Deberán enumerarse 20 núcleos (cada uno de ellos con señales rojas (Chr17) y negras (HER2)). La descripción de los resultados finales del estado de HER2 se basa en la proporción calculada dividiendo la suma de señales HER2 correspondientes a los 20 núcleos, por la suma de señales del cromosoma 17 correspondientes a los 20 núcleos. El estado de la amplificación se considera "amplificado" si la proporción $HER2/Chr17 \geq 2,0$ y "sin amplificar" si es $< 2,0$. Si la proporción $HER2/Chr17$ se encuentra en el intervalo 1,8-2,2, deberán enumerarse otros 20 núcleos. Deberá calcularse entonces una nueva proporción basada en los 40 núcleos y el estado de la amplificación se describirá como ya se ha explicado.



Controles

Las células normales dentro de o adyacentes al área de estudio sirven como controles internos de la tinción. Los núcleos de células normales deben contener un promedio de 1 a 2 puntos negros discretos y 1 a 2 puntos rojos discretos. Si no se detectan copias de un solo gen en ningún portaobjetos del análisis, significa que el portaobjetos no es adecuado para la enumeración. El uso de muestras de control positivo o portaobjetos de xenoinjerto ayudará en la resolución de posibles problemas con el instrumento o con el reactivo.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. ISH es un método de varios pasos que requiere una formación especializada para la selección de los reactivos adecuados, la preparación de la muestra, el procesamiento, la preparación del portaobjetos de ISH y la interpretación de los resultados.
2. La tinción del tejido depende de la manipulación y procesamiento de los tejidos antes de la tinción. La fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, seccionamiento incorrectos o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede introducir anomalías, atrapamiento de anticuerpos o resultados de falso negativo o falso positivo. Los resultados incoherentes pueden ser consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación y embebimiento, o de irregularidades inherentes a los tejidos.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
4. La interpretación clínica de la tinción debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos. Es la responsabilidad de un patólogo calificado que esté familiarizado con los reactivos y métodos utilizados para producir la preparación de la tinción. La tinción se debe realizar en un laboratorio certificado con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles.
5. Ventana proporciona reactivos en una dilución óptima para su uso cuando se siguen las instrucciones proporcionadas. Cualquier desviación de los procedimientos de prueba recomendados puede invalidar los resultados esperados. Los usuarios que se desvían de los procedimientos recomendados del método deben aceptar su responsabilidad en la interpretación de los resultados del paciente en esas circunstancias.
6. Debido a las variaciones en el procesamiento de las muestras, puede ser necesario aumentar o disminuir el tiempo del tratamiento con proteasa ISH. Además, el aumento o la disminución del acondicionamiento celular afectará los resultados de la tinción. El usuario debe validar dichos cambios. Los usuarios que no sigan los procedimientos recomendados para el ensayo son los responsables de la interpretación de los resultados del paciente en estas circunstancias.
7. Los reactivos pueden presentar reacciones inesperadas en tejidos que no se han sometido a pruebas previamente. La posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejidos ya probados, no puede eliminarse por completo debido a la variabilidad biológica de los tejidos. Póngase en contacto con su representante local de apoyo y muéstrele las reacciones inesperadas documentadas.

Limitaciones específicas

1. No todos los fijadores son compatibles con el ensayo. Ventana recomienda utilizar NBF al 10 % durante 6 a 72 horas.
2. El ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail fue desarrollado para teñir secciones de tejido que se cortan en ~4 µm en espesor.²⁸ Las secciones con un grosor superior a 4 µm pueden experimentar pérdida de tejido.
3. Es posible que no estén todos los ensayos registrados en cada instrumento. Póngase en contacto con el representante local de Roche para obtener más información.
4. La oxidación, la decoloración o la desaparición de la señal SISH pueden deberse a ciertas marcas de medios de montaje. Consulte la Tabla 24 para ver la compatibilidad de los medios de montaje.
5. Para impedir la disolución de la señal Red ISH, los portaobjetos teñidos no deben deshidratarse por inmersión en baños de alcohol o acetona. Se recomienda el secado al aire o en un horno. Los portaobjetos teñidos deben estar completamente secos antes de colocarlos los cubreobjetos.
6. Como con cualquier prueba, un resultado negativo significa que el objetivo específico no se ha detectado, y no significa la ausencia de la diana en las células o los tejidos del ensayo.

7. Esta sonda ha sido optimizada para su uso con reactivos VENTANA en instrumentos BenchMark IHC/ISH. Los usuarios que no sigan los procedimientos recomendados para el ensayo son los responsables de la interpretación de los resultados del paciente en estas circunstancias.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento del VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se evaluó mediante estudios de sensibilidad especificidad y reproducibilidad. Toda la tinción se realizó con el protocolo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail como se indica en la Tabla 1 en instrumentos BenchMark IHC/ISH a menos que se especifique lo contrario.

Estudio comparativo de métodos: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en instrumentos BenchMark ULTRA frente a Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Para evaluar la sensibilidad y especificidad clínica del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en la determinación del estado del gen *HER2* en el carcinoma de mama invasivo, se realizó un estudio de comparación de métodos en varios lugares utilizando el dispositivo de comparación Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit. Tres laboratorios centrales participaron en las pruebas de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Se proporcionaron seiscientos treinta y seis casos de carcinoma de mama invasivo humano de tres centros de inscripción clínica para su posible inclusión en el estudio basado en la expresión de la proteína HER2/neu obtenida previamente con IHC. El patrocinador del estudio complementó 133 casos. Los laboratorios centrales que llevaron a cabo el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y el ensayo PathVysion HER-2 FISH desconocían el estado IHC y al identificador original del caso para evitar sesgos en la evaluación de las muestras. Un laboratorio central realizó la tinción de IHC en todas las muestras utilizando el ensayo PATHWAY HER2/neu (4B5) para los análisis adicionales. Los resultados de tinción de los ensayos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y FISH se enumeraron contando al menos 20 núcleos en cada muestra. Los resultados se describieron como Proporción de *HER2/Chr 17* $\geq 2,0$ amplificado; *HER2/Chr 17* $< 2,0$, sin amplificar. De los 678 casos teñidos mediante los ensayos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y FISH, 605 muestras pudieron enumerarse mediante ambos ensayos y, por lo tanto, se incluyeron en el análisis de los índices de concordancia.

Resultados primarios

El análisis primario comparó índices de concordancia porcentual positiva y negativa para demostrar un comportamiento equivalente entre los ensayos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y PathVysion HER-2 FISH. Seguidamente se presentan datos de evaluaciones clínicas con y sin amplificación para cada ensayo, agrupando información de todos los centros, en una tabla 2x2 con índices de concordancia porcentual positiva y negativa, donde el PathVysion HER-2 FISH es el ensayo de referencia. Los criterios de aceptación para demostrar un rendimiento equivalente de estos dos métodos de ensayo cuando se utiliza el instrumento BenchMark ULTRA exigieron que los límites inferiores del intervalo de confianza de la puntuación del 95 % de ambos lados sean del 85 % o superiores cuando se agrupan los datos de los tres centros. Estos criterios de aceptación se cumplieron (Tabla 4). Asimismo, todos los índices de concordancia positiva y negativa por centros superaron el 85 % (Tabla 5).

Tabla 4. Acuerdo entre VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit en una cohorte de especímenes de carcinoma de mama humano.

Resultado VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Resultado PathVysion HER-2 FISH		
	Amplificado	No amplificado	Total
Amplificado	270	12	282
No amplificado	32	291	323
Total	302	303	605
	n/N	% (puntuación 95 % CI)	
Concordancia porcentual positiva	270/302	89,4 (85,4, 92,4)	
Concordancia porcentual negativa	291/303	96,0 (93,2, 97,7)	

Tabla 5. Resumen de los índices de concordancia globales negativos, positivos y generales para VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sobre las muestras de carcinoma de mama humano, presentadas por centro.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail frente a PathVysion HER-2 FISH	Concordancia porcentual positiva	Concordancia porcentual negativa	Concordancia porcentual global
Centro A: n/N (%) (CI del 95 %)	92/100 (92,0 %) (85,0, 95,9)	92/93 (98,9 %) (94,2, 99,8)	184/193 (95,3 %) (91,4, 97,5)
Centro B: n/N (%) (CI del 95 %)	93/103 (90,3 %) (83,0, 94,6)	108/119 (90,8 %) (84,2, 94,8)	201/222 (90,5 %) (86,0, 93,7)
Centro C: n/N (%) (CI del 95 %)	85/99 (85,9 %) (77,7, 91,4)	91/91 (100,0 %) (95,9, 100,0)	176/190 (92,6 %) (88,0, 95,6)

Estos datos indican una excelente concordancia entre el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y PathVysion HER-2 FISH Kit a la hora de determinar el estado del gen *HER2* en muestras de carcinoma de mama humano.

Resultados secundarios

El porcentaje de acuerdo general entre VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y PathVysion HER-2 FISH Kit y su CI de puntuación bilateral del 95 %, agrupando datos de todos los centros clínicos, fue del 92,7 % (90,4; 94,5).

Resultados secundarios: IHC frente a ISH para el estado de HER2

El Estudio de Comparación de Métodos que compara VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y PathVysion FISH fue diseñado para evaluar también casos basados en sus puntuaciones IHC para los niveles de proteína HER2. Esto hizo posible un análisis secundario para comparar ambos ensayos ISH con las puntuaciones inmunohistoquímicas y obtener los índices de concordancia en el estado del HER2. La comparación de los ensayos se basó en orientaciones de la FDA, que consideran la presencia de dos, tres o más casos como constatación positiva de sobreexpresión del HER2. En primer lugar, partiendo de las orientaciones de la FDA sobre puntuaciones, PathVysion HER-2 FISH se utilizó como patrón de referencia, demostrando que el índice de concordancia positiva y el intervalo de confianza de la puntuación del 95 % para PATHWAY HER2/neu (4B5) comparado con FISH fue del 91,1 % (87,4; 93,8) (Tabla 6). Del mismo modo, cuando VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se utilizó como patrón de referencia, el índice de concordancia positiva para PATHWAY HER2/neu (4B5) comparado con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail fue del 93,2 % (89,6; 95,7) (Tabla 7).

Tabla 6. IHC en el instrumento BenchMark ULTRA y comparación de FISH según orientaciones de la FDA: Datos agrupados de todos los centros.

		Resultado PathVysion HER-2 FISH		
		Amplificado	No amplificado	Total
Resultados PATHWAY HER2/neu (4B5)	Positivo (2/3 o más casos)	277	63	340
	Negativo (0/1+)	27	238	265
	Total	304	301	605
	n/N	% (puntuación 95 % CI)		
Concordancia porcentual positiva	277/304	91,1 (87,4, 93,8)		

Tabla 7. IHC en el instrumento BenchMark ULTRA y comparación del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail según orientaciones de la FDA: Datos agrupados de todos los centros.

		Resultado VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail		
		Amplificado	No amplificado	Total
Resultados PATHWAY HER2/neu (4B5)	Positivo (2/3 o más casos)	248	78	326
	Negativo (0/1+)	18	253	271
	Total	266	331	597
		n/N	% (Puntuación 95 % CI)	
Concordancia porcentual positiva		248/266	93,2 (89,6, 95,7)	

Estudio comparativo de métodos: Ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en instrumento BenchMark ULTRA frente a ensayo Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

Para evaluar la sensibilidad y especificidad clínica del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en la determinación del estado del gen *HER2* en el carcinoma gástrico, se realizó un estudio de comparación de métodos utilizando Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit para la hibridación fluorescente in situ (FISH). La comparabilidad del ensayo en muestras de la unión gástrica y gástrica y gastroesofágica se determinó comparando los resultados de las tinciones de los dos ensayos (Tabla 8). Ciento treinta y cuatro muestras de la unión gástrica humana y 12 de la unión gastroesofágica (una mezcla de casos amplificados y no amplificados) fueron teñidos usando VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. La misma cohorte fue teñida con un ensayo Dako HER2 IQFISH pharmDx™. La Tabla 8 y la Tabla 9 presentan los índices de concordancia negativa, positiva y global para las 146 muestras clínicas de esta cohorte que pudieron enumerarse tanto con el ensayo Dako HER2 IQFISH pharmDx™ como con el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Tabla 8. Concordancia entre VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y el ensayo Dako HER2 IQFISH pharmDx™ en una cohorte de muestras de carcinoma gástrico humano.

Estado de amplificación VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Estado de amplificación del ensayo Dako HER2 IQFISH pharmDx™	
	Amp	Non-Amp
Amp	49	8
Non-Amp	5	84

Tabla 9. Resumen de los índices de concordancia globales negativos, positivos y generales para VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail y Dako HER2 IQFISH pharmDx™ en muestras de carcinoma gástrico humano.

	Índice de concordancia negativa		Índice de concordancia positiva		Índice de concordancia global	
	Datos brutos / n.º de casos	Porcentaje (CI puntuación 95 %)	Datos brutos / n.º de casos	Porcentaje (CI puntuación 95 %)	Datos brutos / n.º de casos	Porcentaje (CI puntuación 95 %)
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	84/92	91,3 (83,8 – 95,5)	49/54	90,7 (80,1 – 96,0)	133/146	91,1 (85,4 – 94,7)

Repetibilidad y precisión del instrumento BenchMark IHC/ISH con el carcinoma de mama

La repetibilidad y la precisión de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se evaluaron en los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX en combinación con el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Se evaluó la repetibilidad dentro de un mismo análisis utilizando veintiocho muestras de carcinomas de mama (BC). Se teñieron dos portaobjetos replicados de cada una de las muestras de BC con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en un solo instrumento BenchMark ULTRA, XT o GX. Para el análisis de los datos de los instrumentos BenchMark XT y GX, se ponderaron los casos de proporción límite con respecto a su prevalencia.

También se evaluó la precisión intermedia entre días utilizando muestras BC. Los portaobjetos replicados de cada uno de los veintiocho especímenes fueron teñidos con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX en 5 días no consecutivos. Para el análisis de los datos de los instrumentos BenchMark XT y GX, se ponderaron los casos de proporción límite con respecto a su prevalencia.

La repetibilidad dentro del análisis se determinó con una concordancia positiva promedio (APA), una concordancia negativa promedio (ANA) y una concordancia porcentual global (OPA). Se determinó la precisión intermedia entre días con concordancia porcentual positiva (PPA), concordancia porcentual negativa (NPA) y concordancia porcentual global (OPA) en todas las observaciones a partir de la población evaluable. En la Tabla 10, se resumen los resultados de ambos estudios.

Tabla 10. Repetibilidad dentro del análisis y precisión intermedia entre días del instrumento BenchMark ULTRA, XT y GX

Plataforma	Repetibilidad / precisión	Estado clínico	Concordancia			
			Tipo	n/N	%	CI 95 %
ULTRA	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	146/146	100	(97,4, 100)
		No amplificado	ANA	188/188	100	(98,0, 100)
		Total	OPA	167/167	100	(97,8, 100)
ULTRA	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	144/144	100	(97,4, 100)
		No amplificado	NPA	189/191	99,0	(96,7, 100)
		Total	OPA	333/335	99,4	(98,2, 100)
XT	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	128,8/128,8	100	(97,1, 100)
		No amplificado	ANA	151,2/151,2	100	(97,5, 100)
		Total	OPA	140,0/140,0	100	(97,3, 100)
XT	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	128,8/128,8	100	(97,1, 100)
		No amplificado	NPA	151,2/151,2	100	(97,5, 100)
		Total	OPA	280,0/280,0	100	(98,6, 100)
GX	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	128,8/128,8	100	(97,1, 100)
		No amplificado	ANA	151,2/151,2	100	(97,5, 100)
		Total	OPA	140,0/140,0	100	(97,3, 100)

Farm. ROBERTA MELE MAZZA
 PRODOTTI ROCHE S.A.Q.e I.
 DIVISIONE DIAGNOSTICA
 CREDIT & APODERADA LEGAL

Plataforma	Repetibilidad / precisión	Estado clínico	Concordancia			
			Tipo	n/N	%	CI 95 %
GX	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	128,8/ 128,8	100	(97,1, 100)
		No amplificado	NPA	151,2/ 151,2	100	(97,5, 100)
		Total	OPA	280,0/ 280,0	100	(98,6, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. Se incluyeron cuatro casos de estado límite en el estudio.

Precisión intermedia entre instrumentos con carcinoma de mama

La precisión intermedia entre instrumentos del instrumento BenchMark IHC/ISH del VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó tiñendo portaobjetos replicados de veintiocho muestras BC en 3 instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y el VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La precisión intermedia entre instrumentos se determinó con PPA, NPA y OPA entre todas las observaciones de la población evaluable. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia. En la Tabla 11, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 11. Precisión intermedia entre instrumentos de BenchMark IHC/ISH

Plataforma	Precisión	Estado clínico	Concordancia			
			Tipo	n/N	%	CI 95 %
ULTRA	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	72,0/ 72,0	100	(94,9, 100)
		No amplificado	NPA	94,0/ 96,0	97,9	(95,8, 100)
		Total	OPA	166,0/ 168,0	98,8	(97,6, 100)
XT	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	77,3/ 77,3	100	(95,3, 100,0)
		No amplificado	NPA	90,7/ 90,7	100	(95,9, 100,0)
		Total	OPA	168,0/ 168,0	100	(97,8, 100,0)
GX	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	76,2/ 76,2	100	(95,2, 100)
		No amplificado	NPA	90,7/ 90,7	100	(95,9, 100)
		Total	OPA	166,9/ 166,9	100	(97,8, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. Se incluyeron cuatro casos de estado límite en el estudio.

Precisión intralector y entre lectores con carcinoma de mama

La precisión intralector y entre lectores del instrumento BenchMark IHC/ISH con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó haciendo que tres lectores evaluaran veintiocho muestras BC teñidas con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA. Para mayor precisión dentro del lector, el mismo juego de portaobjetos se leyó dos veces después de un mínimo de dos semanas entre lecturas. La precisión intralector y entre lectores se determinó con APA,

ANA y OPA a través de todas las observaciones de la población evaluable. En la Tabla 12, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 12. Precisión del instrumento BenchMark ULTRA intralector y entre lectores

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI 95 %
Entre lectores	Amplificado	APA	146/158	92,4	(90,2, 94,7)
	No amplificado	ANA	166/178	93,3	(90,7, 95,7)
	Total	OPA	156/168	92,9	(90,5, 95,2)
Intralector	Amplificado	APA	76/78	97,4	(95,0, 100,0)
	No amplificado	ANA	88/90	97,8	(95,5, 100,0)
	Total	OPA	82/84	97,6	(95,2, 100,0)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson.

Precisión entre plataformas con carcinoma de mama

La precisión entre plataformas del instrumento BenchMark IHC/ISH con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó evaluando veintiocho muestras BC teñidas con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit en instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX. La precisión entre plataformas se determinó con PPA, NPA y OPA entre todas las observaciones de la población evaluable. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia. En la Tabla 13, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 13. Precisión entre plataformas del instrumento BenchMark IHC/ISH

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI 95 %
Precisión entre plataformas	Amplificado	PPA	230,8/ 230,8	100	(98,4, 100)
	No amplificado	NPA	271,0/ 272,2	99,6	(98,3, 100)
	Total	OPA	501,8/ 502,9	99,8	(99,2, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. Se incluyeron cuatro casos de estado límite en el estudio.

Repetibilidad y precisión del instrumento BenchMark IHC/ISH con el carcinoma gástrico

La repetibilidad y la precisión de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se evaluaron en los instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX en combinación con el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Se evaluó la repetibilidad dentro del análisis utilizando catorce muestras de carcinoma gástrico (GC). Se tiñeron dos portaobjetos replicados de cada una de las muestras de GC con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en un solo instrumento BenchMark ULTRA, XT o GX. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia.

También se evaluó la precisión intermedia entre días utilizando muestras de GC. Los portaobjetos replicados de cada una de las catorce muestras fueron teñidos con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX en 5 días no consecutivos. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia.

La repetibilidad dentro del análisis se determinó con una concordancia positiva promedio (APA), una concordancia negativa promedio (ANA) y una concordancia porcentual global (OPA). Se determinó la precisión intermedia entre días con concordancia porcentual positiva (PPA), concordancia porcentual negativa (NPA) y concordancia porcentual global (OPA) en todas las observaciones a partir de la población evaluable. En la Tabla 14, se resumen los resultados de ambos estudios.

Tabla 14. Repetibilidad dentro del análisis y precisión intermedia entre días del instrumento BenchMark ULTRA, XT y GX

Plataforma	Repetibilidad / precisión	Estado clínico	Concordancia			
			Tipo	n/N	%	CI 95 %
ULTRA	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		No amplificado	ANA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		Total	OPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
ULTRA	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		No amplificado	NPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		Total	OPA	140,0/ 140,0	100	(97,3, 100)
XT	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		No amplificado	ANA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		Total	OPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
XT	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		No amplificado	NPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		Total	OPA	140,0/ 140,0	100	(97,3, 100)
GX	Repetibilidad dentro del ensayo	Amplificado	APA	64,6/ 65,1	99,1	(95,9, 100)
		No amplificado	ANA	70,0/ 70,6	99,2	(95,2, 100)
		Total	OPA	67,3/ 67,9	99,2	(96,9, 100)
GX	Precisión intermedia entre días	Amplificado	PPA	67,3/ 67,9	99,2	(96,5, 100)
		No amplificado	NPA	70,0/ 70,0	100	(94,8, 100)
		Total	OPA	137,3/ 137,9	99,6	(98,5, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. En el estudio se incluyeron dos casos de estado límite.

Precisión intermedia entre instrumentos con carcinoma gástrico

La precisión intermedia entre instrumentos del instrumento BenchMark IHC/ISH del VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó tiñendo portaobjetos replicados de catorce muestras GC en 3 instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y el VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La precisión intermedia entre

instrumentos se determinó con PPA, NPA y OPA entre todas las observaciones de la población evaluable. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia. En la Tabla 15, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 15. Precisión intermedia entre instrumentos de BenchMark IHC/ISH

Plataforma	Precisión	Estado clínico	Concordancia			
			Tipo	n/N	%	CI 95 %
ULTRA	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	42,0/ 42,0	100	(91,6, 100)
		No amplificado	NPA	42,0/ 42,0	100	(91,6, 100)
		Total	OPA	84,0/ 84,0	100	(95,6, 100)
XT	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	40,4/ 40,9	98,6	(94,1, 100)
		No amplificado	NPA	40,9/ 40,9	100	(91,4, 100)
		Total	OPA	81,3/ 81,9	99,3	(97,5, 100)
GX	Precisión intermedia entre instrumentos	Amplificado	PPA	40,9/ 40,9	100	(91,4, 100)
		No amplificado	NPA	42,0/ 42,0	100	(91,6, 100)
		Total	OPA	82,9/ 82,9	100	(95,6, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. En el estudio se incluyeron dos casos de estado límite.

Precisión intralector y entre lectores con carcinoma de gástrico

La precisión intralector y entre lectores del instrumento BenchMark IHC/ISH con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó haciendo que tres lectores evaluaran veintiocho muestras GC teñidas con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit en el instrumento BenchMark ULTRA. Todos los portaobjetos se asignaron al azar y se enmascararon con el diagnóstico del caso. Para mayor precisión dentro del lector, el mismo juego de portaobjetos se leyó dos veces después de un mínimo de dos semanas entre lecturas. La precisión intralector y entre lectores se determinó con APA, ANA y OPA a través de todas las observaciones de la población evaluable. En la Tabla 16, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 16. Precisión del instrumento BenchMark ULTRA intralector y entre lectores

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI 95 %
Entre lectores	Amplificado	APA	80/84	95,2	(90,5, 100,0)
	No amplificado	ANA	80/84	95,2	(90,5, 100,0)
	Total	OPA	80/84	95,2	(90,5, 100,0)
Intralector	Amplificado	APA	82/84	97,6	(95,2, 100,0)
	No amplificado	ANA	82/84	97,6	(95,2, 100,0)
	Total	OPA	82/84	97,6	(95,2, 100,0)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson.

Firma: ROBERTA MELE MAZZA
PRODUCTOS ROCHE S.A.Q. S. I.
DIVISION DIAGNOSTICA
CO-DT & APODERADA LEGAL

Precisión entre plataformas con carcinoma gástrico

La precisión entre plataformas del instrumento BenchMark IHC/ISH con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó evaluando catorce muestras GC teñidas con el VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizando el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y el VENTANA Red ISH DIG Detection Kit en instrumentos BenchMark ULTRA, XT y GX. La precisión entre plataformas se determinó con PPA, NPA y OPA entre todas las observaciones de la población evaluable. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia. En la Tabla 17, se resumen los resultados de este estudio.

Tabla 17. Precisión entre plataformas del instrumento BenchMark IHC/ISH

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI 95 %
Precisión entre plataformas	Amplificado	PPA	123,3/ 123,9	99,5	(98,1, 100)
	No amplificado	NPA	124,9/ 124,9	100	(97,0, 100)
	Total	OPA	248,2/ 248,8	99,8	(99,2, 100)

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. En el estudio se incluyeron dos casos de estado límite.

Precisión entre lotes con carcinoma de mama

La precisión entre lotes se determinó probando 3 lotes de producción del VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit en instrumentos BenchMark ULTRA. Se teñieron veintiocho casos BC con cada sonda y kit de detección. En la Tabla 18 se muestra un resumen de los resultados de la precisión entre lotes del ensayo.

Tabla 18. Precisión entre lotes

Precisión	Estado clínico	Concordancia			
		Tipo	n/N	%	CI 95 %
Entre lotes	Amplificado	PPA	121/121	100	96,9, 100
	No amplificado	NPA	123/123	100	97,0, 100
	Total	OPA	244/244	100	98,5, 100

Nota: Los CIs del 95 % se calcularon utilizando el método bootstrap percentil; en los casos en los que la estimación puntual fue del 100 %, se utilizó el método de puntuación de Wilson. Se incluyeron cuatro casos de estado límite en el estudio.

Estudio de reproducibilidad entre laboratorios del instrumento BenchMark ULTRA con carcinoma de mama y gástrico

Se realizó un estudio de reproducibilidad entre laboratorios para evaluar la reproducibilidad de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail para determinar el estado del gen *HER2* en el tejido del carcinoma gástrico y de mama teñido en el instrumento BenchMark ULTRA en combinación con el VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit el VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Se utilizaron 28 muestras de tejido de carcinoma de mama y gástrico de FFPE y aproximadamente la mitad de estos casos se amplificaron para el estado de expresión de *HER2* y la otra mitad no se amplificaron para el estado de *HER2*.

Se cortaron varias secciones de tejido de cada muestra y se suministraron a 3 centros de estudios externos. Cada centro teñió 28 casos gástricos y 28 casos de mama en cada uno de los 5 días no consecutivos durante un mínimo de 20 días. Después de teñir el instrumento BenchMark ULTRA, un lector evaluó cada portaobjetos para asignar el estado del gen *HER2*.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 19 y la tabla Tabla 20 siguiente. Los datos se analizaron para obtener una concordancia porcentual positiva (PPA) y una

concordancia porcentual negativa (NPA) en todas las observaciones. Para cada caso, todas las observaciones evaluables (amplificadas frente a sin amplificar) se compararon respecto al resultado modal de cada caso. Los casos de proporción límite se ponderaron en función de su prevalencia. Se recopilaron estas comparaciones de centros y días para luego agrupar los resultados por casos.

Tabla 19. ILR: índices de concordancia en el instrumento BenchMark ULTRA para el carcinoma de mama

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia				
	Tipo	n/N	%	CI 95 %	
Entre centros (3 centros)	PPA	208,9/208,9	100	(98,2, 100,0)	
	NPA	198,1/200,3	98,9	(96,8, 100,0)	
	OPA	407,0/409,3	99,5	(98,4, 100,0)	
Entre días (5 días no consecutivos)	Centro A	PPA	72/74	97,3	(92,3, 100,0)
		NPA	63/63	100	(94,3, 100,0)
		OPA	135/137	98,5	(95,6, 100,0)
	Centro B	PPA	70/70	100	(94,8, 100,0)
		NPA	63/64	98,4	(95,8, 100,0)
		OPA	133/134	99,3	(97,8, 100,0)
	Centro C	PPA	70/70	100	(94,8, 100,0)
		NPA	69/69	100	(94,7, 100,0)
		OPA	139/139	100	(97,3, 100,0)

Tabla 20. ILR: índices de concordancia en el instrumento BenchMark ULTRA para el carcinoma gástrico

Reproducibilidad entre laboratorios	Concordancia				
	Tipo	n/N	%	CI 95 %	
Entre centros (3 centros)	PPA	206,8/206,8	100	(98,2, 100,0)	
	NPA	208,4/208,9	99,7	(99,2, 100,0)	
	OPA	415,1/415,7	99,9	(99,6, 100,0)	
Entre días (5 días no consecutivos)	Centro A	PPA	70/70	100	(94,8, 100,0)
		NPA	69/70	98,6	(96,0, 100,0)
		OPA	139/140	99,3	(97,9, 100,0)
	Centro B	PPA	67/67	100	(94,6, 100,0)
		NPA	69/69	100	(94,7, 100,0)
		OPA	136/136	100	(97,3, 100,0)
	Centro C	PPA	70/70	100	(94,8, 100,0)
		NPA	70/70	100	(94,8, 100,0)
		OPA	140/140	100	(97,3, 100,0)

Sensibilidad/especificidad analítica

La especificidad analítica (eficacia de hibridación) del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó teñiendo las dispersiones normales de la metafase humana en un instrumento BenchMark XT. Un 100 % de las 125 extensiones de la metafase analizadas presentaron colocalización específica de las sondas de *HER2* y de cromosoma 17.

La sensibilidad analítica mide la capacidad de la sonda para detectar su diana específica, mientras que la especificidad es su capacidad para distinguir la diana de otras secuencias en la muestra. El ensayo tiene un control de sensibilidad y especificidad analítica integrado en cada tejido humano. Las células humanas normales (incluyendo: fibroblastos estromales, células endoteliales, linfocitos y células epiteliales de mama no neoplásicas) deben contener 1-2 copias de *HER2* y *Chr17*. Por lo tanto, 1-2 copias para *HER2* y *Chr17* en células humanas normales indican que las sondas están detectando su diana específica (una medida de sensibilidad). Una o dos copias para *HER2* y *Chr17* en células normales también indica que la sonda solo detecta sus dianas específicas (una medida de especificidad). El primer índice de aprobación para el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en 40 muestras de mama fijadas dentro de las directrices ASCO CAP (NBF al 10 % durante 6 a 72 horas) fue del 100 % (91,2 - 100) en los instrumentos BenchMark ULTRA, del 100 % (91,2 - 100) en los instrumentos BenchMark XT y del 97,5 % (87,1 - 99,6) en los instrumentos BenchMark GX. La especificidad en las mismas 40 muestras de mama sin control de sonda fue del 100 % (91,2 - 100) en los instrumentos BenchMark ULTRA.

El primer índice de aprobación para el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en 39 muestras gástricas fijadas dentro de las directrices ASCO CAP (NBF al 10 % durante 6 a 72 horas) fue de 97,4% (86,8 - 99,5) en los instrumentos BenchMark ULTRA, 97,4% (86,8 - 99,5) en los instrumentos BenchMark XT y 100 % (91 - 100) en los instrumentos BenchMark GX.

La sensibilidad y especificidad analíticas también se evaluaron teniendo múltiples casos de tejidos humanos normales y neoplásicos con ensayos VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit y VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Los resultados se indican en la Tabla 21 y en la Tabla 22. No se observó ninguna tinción inesperada con el ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail en los tejidos normales y neoplásicos. *El número de carcinomas de mama y adenocarcinomas gástricos invasivos incluye estudios descritos anteriormente.

Tabla 21. La sensibilidad/especificidad analítica del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó analizando tejidos normales FFPE.

Tejido	N.º de casos aceptables / totales	Tejido	N.º de casos aceptables / totales
Glándula suprarrenal	3/3	Pulmón	3/3
Vejiga	3/3	Ganglio linfático	3/3
Médula ósea	3/3	Mesotelio	3/3
Ovario	3/3	Páncreas	3/3
Mama	3/3	Glándula paratiroides	3/3
Cerebelo	3/3	Nervio periférico	3/3
Cerebro	3/3	Próstata	3/3
Cuello del útero	3/3	Músculo esquelético	3/3
Colon	3/3	Piel	3/3
Endometrio	3/3	Bazo	3/3
Esófago	3/3	Estómago	3/3
Corazón	3/3	Testículos	3/3
Hipófisis (pituitaria)	3/3	Timo	3/3
Intestino	3/3	Tiroides	3/3
Riñón	3/3	Lengua/Glándula salival	3/3
Hígado	3/3	Amígdala	3/3

Tabla 22. La sensibilidad/especificidad analítica del ensayo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se determinó analizando varios tejidos neoplásicos FFPE.

Patología	N.º de casos aceptables / totales
Glioblastoma (cerebro)	3/3
Meningioma (cerebro)	1/1
Oligodendroglioma (cerebro)	1/1
Carcinoma endometriode (ovario)	1/1
Adenocarcinoma (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)	1/1
Carcinoma papilar (tiroides)	1/1
Carcinoma ductal in situ (mama)	1/1
Carcinoma de células pequeñas (pulmón)	1/1
Carcinoma de células escamosas (pulmón)	1/1
Adenocarcinoma (esófago)	1/1
Carcinoma de células escamosas (esófago)	1/1
Adenocarcinoma (estómago)	1/1
Adenocarcinoma (unión gastroesofágica)	1/1
Adenocarcinoma (Intestino delgado)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (intestino delgado)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (Colon)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	1/1
Adenocarcinoma (recto)	1/1
Tumor estromal gastrointestinal (GIST) (Recto)	1/1
Hepatoblastoma (hígado)	1/1
Carcinoma hepatocelular (hígado)	1/1
Carcinoma de células claras (riñón)	1/1
Adenocarcinoma (próstata)	2/2
Leiomioma (útero)	1/1
Adenocarcinoma endometriode (útero)	1/1
Carcinoma de células claras (útero)	1/1
Carcinoma de células escamosas (cuello uterino)	2/2
Rabdomiosarcoma embrional (músculo estriado)	1/1
Carcinoma de células escamosas (piel)	1/1
Carcinoma de células basales (piel)	1/1
Neurofibroma (columna lumbar)	1/1

Patología	N.º de casos aceptables / totales
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	1/1
Linfoma de linfocitos B, NOS (ganglio linfático)	2/2
Linfoma de Hodgkin (ganglio linfático)	3/3
Linfoma anaplásico de células grandes (ganglio linfático)	1/1
Leiomioma (vejiga)	1/1
Carcinoma urotelial (vejiga)	1/1
Osteosarcoma	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	1/1
Leiomioma (músculo liso)	1/1

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Tabla 23. Resolución de problemas.

Problema	Solución
Tinción SISH ausente o débil	<ol style="list-style-type: none"> Compruebe que los dispensadores de reactivo funcionan correctamente (es decir, que no estén obstruidos ni vacíos) y que los recipientes de fluidos estén llenos. Revise la cámara de cebado del dispensador de reactivo o el menisco para ver si hay partículas o cuerpos extraños tales como fibras o precipitados. Si el dispensador está bloqueado, no lo utilice y póngase en contacto con su representante local. De lo contrario, vuelva a cebar el dispensador dirigiéndolo hacia un recipiente de desechos, quite la tapa del inyector y presione hacia abajo la parte superior del dispensador. Si la tinción sigue siendo débil o inexistente, pase al punto 2. Compruebe que el grosor de la sección, el tiempo y el tipo de la fijación son adecuados para los ensayos de base ISH. Compruebe el uso de medios de montaje compatibles con SISH (véase la Tabla 24) para preservar la señal SISH. Si la tinción sigue siendo débil o inexistente, pase al punto 4. Aumente el tiempo de CC1 a > 16 min. Aumente el tiempo de CC2 a > 16 min para el carcinoma gástrico o > 24 min para el carcinoma de mama. Aumente el tiempo de ISH Protease 3 a > 16 min para el carcinoma gástrico o > 20 min para el carcinoma de mama si la morfología nuclear está intacta.
Tinción roja ausente o débil	<ol style="list-style-type: none"> Compruebe que los dispensadores de reactivo funcionan correctamente (es decir, que no estén obstruidos ni vacíos) y que los recipientes de fluidos estén llenos. Si la tinción sigue siendo débil o inexistente, pase al punto 2. Compruebe que los baños de alcohol y los lavados de xileno extendidos no se utilicen para deshidratar portaobjetos teñidos, porque se degradarán las señales ISH-rojo. Si la tinción sigue siendo débil o inexistente, pase al punto 3. Compruebe que el grosor de la sección, el tiempo y el tipo de la fijación son adecuados para los ensayos de base ISH. Aumente el tiempo de CC1 a > 16 min. Aumente el tiempo de CC2 a > 16 min para el carcinoma gástrico o > 24 min para el carcinoma de mama. Aumente el tiempo de ISH Protease 3 a > 16 min para el carcinoma gástrico o > 20 min para el carcinoma de mama si la morfología nuclear está intacta.

Problema	Solución
Fondo ISH-rojo inespecífico	<ol style="list-style-type: none"> Compruebe que se utilizan portaobjetos cargados positivamente y que la muestra se ha fijado y cortado adecuadamente para ensayos basados en ISH. Si el fondo ISH rojo es discernible de la señal ISH roja específica, enumere el portaobjetos pero no cuente señales ISH rojo inespecíficas. Si el fondo ISH rojo del núcleo afecta a la enumeración, repita la tinción utilizando una temperatura de lavado de astringencia a 76 °C o 78 °C. Acortando el período de acondicionamiento de las células o de la proteasa también se atenúa el fondo rojo.
Fondo SISH inespecífico	<ol style="list-style-type: none"> Compruebe que se utilizan portaobjetos cargados positivamente y que la muestra se ha fijado y cortado adecuadamente para ensayos basados en ISH. Si el fondo SISH es discernible de la señal SISH específica, enumere el portaobjetos pero no cuente señales inespecíficas. Si el fondo SISH del núcleo afecta a la enumeración, repita la tinción con un tratamiento de proteasa más bajo o con un tiempo de acondicionamiento de las células menor.
Precipitado	<ol style="list-style-type: none"> Si el artefacto de precipitado afecta a la enumeración, repita la tinción. Si el fondo SISH es discernible de la señal SISH específica, enumere el portaobjetos pero no cuente señales inespecíficas. Compruebe que las etiquetas del código de barras del portaobjetos están centradas y que se han aplicado al porta de vidrio sin superposición de etiquetas. No doble la etiqueta ni vuelva a aplicar etiquetas de código de barras.
Burbujeo	Si el burbujeo afecta a la enumeración, compruebe que los procedimientos preanalíticos y el grosor de las muestras siguen las recomendaciones.
Se desprende tejido del portaobjetos.	Asegúrese de que los portaobjetos tengan carga positiva.

Tabla 24. Compatibilidad de medios de montaje con ensayos de base SISH.

Medios de montaje	Fabricante	Tipo (xileno, alcohol, acuoso)	Compatibilidad con SISH
Entellan	Merck	Xileno	No
Entellan New	Merck	Xileno	No
Eukitt	EMS	Xileno	No
HSR	Systemex	Xileno	No
Malinol	Muto Chemical	Xileno	No
Acrytol	SurgiPath	Xileno	Si
Alcolmount	Diapath	Alcohol	Si
BioMount 2	BBInternational	Xileno	Si
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xileno	Si
Diamount	Diapath	Xileno	Si
DPX	BDH: Raymond Lamb	Xileno	Si
FloTexx	Lerner Labs	Xileno	Si
Gel Mount	Biomedica	Acuoso	Si

Medios de montaje	Fabricante	Tipo (xileno, alcohol, acuoso)	Compatibilidad con SISH
Histomount	Raymond Lamb	Xileno	Si
MicroMount	SurgiPath	Xileno	Si
MM24	SurgiPath	Xileno	Si
Mountex	Histolab	Xileno	Si
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Acuoso	Si
Paramount	Protaqs Quartett: Dako	Xileno	Si
Permound	Fisher	Xileno	Si
Pertex	Cell Path	Xileno	Si
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xileno	Si
Softmount	WAKO	Lemasol A	Si
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xileno	Si
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xileno	Si
Ultramount	Dako	Xileno	Si

14. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20:719-726.
15. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol.* 2005;23:2162-2171.
16. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med.* 2001;344:783-792.
17. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23:4265-4274.
18. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1659-1672.
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1673-1684.
20. Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol.* 2003;173-182.
21. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697.
22. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
23. Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:775-780.
24. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* 2009;22:1457-1467.
25. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2007.
26. CLSI (formerly NCCLS). *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
27. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol.* 2009 Mar;10:267-277.
28. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:361-370.
2. Muleris M, et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;76:34-5.
3. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230:1132-1139.
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244:707-712.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235:177-182.
6. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg.* 1998;175:73-75.
7. O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, et al. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer.* 1991;63:444-446.
8. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene.* 1997;15:537-547.
9. Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res.* 1993;53:4960-4970.
10. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence *in situ* hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1997;15:2894-2904.
11. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1992;10:1049-1056.
12. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer.* 1993;67:625-629.
13. Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erbB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer.* 1991;49:650-655.

PROPIEDAD INTELECTUAL

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

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
www.ventana.com



Farm. ROBERTA MELE MAZZA
PRODOTTI ROCHE S.A.Q.e I.
DIVISIONE DIAGNOSTICA
CO. DI & APODERATA LEGAL



Apéndice A: Formulario de puntuación de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

1. ID del caso / ID del paciente: 2. ¿Este caso es enumerable? 2a. Sí - Pase al n.º 3 2b. No - Prescinda del n.º 3. Pase al n.º 4 3. ¿Hay heterogeneidad del tumor? 3a. Sí, saltar n.4. Pase al n.º 5. 3b. No - Prescinda del n.º 4. Pase al n.º 5.

4. Este caso no es enumerable porque (marque TODO lo que proceda): 4a. No quedaba tejido en el portaobjetos teñido con ISH 4b. No había ningún carcinoma invasor en el tejido del portaobjetos teñido con ISH 4c. La morfología nuclear es inaceptable; incapaz de distinguir los elementos estructurales del tejido presentes en las células normales, de los observados en las células del carcinoma en estudio. 4d. Fondo inaceptable, afecta la puntuación del portaobjetos teñido con ISH

4e. No se detecta la señal del control positivo interno 4f. Tinción de ISH débil/inexistente en las células en estudio, incapaz de puntuar 4g. Otras observaciones (especifique):

5. Enumere el área de estudio 1: Cuente la señal HER2 y la señal Chr17 en cada uno de los 20 núcleos. Añada los recuentos de la señal HER2. Añada los recuentos de Chr17. Calcule la proporción del estado del gen, dividiendo el recuento TOTAL de señales HER2 por el recuento TOTAL de señales Chr17. Redondee en décimas de la unidad. Documente si se han contado cúmulos de señales.

Table with 20 columns for nucleic acid counts (01-20), TOTAL, PROPORCIÓN, and ¿Presencia de cúmulos? for HER2 and Chr17.

6. Resultados obtenidos de 20 núcleos: 6a. Sin amplificar: HER2/Chr17 < 2,0 o bien 6b. Amplificado: HER2/Chr17 ≥ 2,0 Si la proporción HER2/Chr17 queda entre 1,8 y 2,2, deberán enumerarse otros 20 núcleos.

7. Enumere el área de estudio 2: Cuente la señal HER2 y la señal Chr17 en cada uno de los 20 núcleos. Añada los recuentos de la señal HER2. Añada los recuentos de Chr17. Documente si se han contado cúmulos de señales.

Table with 20 columns for nucleic acid counts (01-20), TOTAL, PROPORCIÓN, and ¿Presencia de cúmulos? for HER2 and Chr17 in area 2.

8. Resultados obtenidos de los 40 núcleos: 8a. Total HER2 en área de estudio 1 + Total HER2 en área de estudio 2 = Recuento total HER2 8b. Total Chr17 en área de estudio 1 + Total Chr17 en área de estudio 2 = Recuento total Chr17 8c. Proporción: Total Her2 / Total Chr17 8d. Resultado final de los 40 núcleos: Sin amplificar: HER2/Chr17 < 2,0 o bien Amplificado: HER2/Chr ≥ 2,0

Puntuado por: _____

Fecha: _____

Farm. ROBERTA MELE MAZZA PRODUCTOS ROCHE S.A.Q.e i. DIVISION DIAGNOSTICA CO-DT & APODERADA LEGAL



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2020 - Año del General Manuel Belgrano

Hoja Adicional de Firmas
Informe gráfico

Número:

Referencia: RESPUESTA A EX-2020-41859033 (2)

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 20 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.08.24 16:03:06 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2020.08.24 16:03:09 -03:00