

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043

08314373001

IVD Σ 30

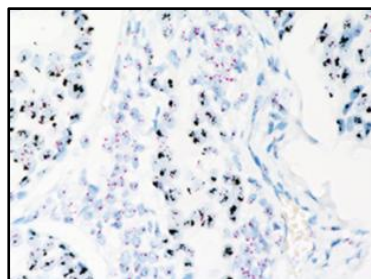


Figure 1. Résultat du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur un carcinome mammaire indiquant un statut HER2 amplifié.

UTILISATION PREVUE

Le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est destiné à l'établissement du statut du gène *HER2* par détermination par microscopie optique du rapport entre le nombre de copies du gène *HER2* et du nombre de Chromosome 17. Les sondes *HER2* et Chromosome 17 sont détectées par hybridation in situ chromogénique bicolore (ISH) dans des échantillons de tissus humains de carcinome mammaire et gastrique fixés au formol et inclus en paraffine, y compris la jonction gastro-œsophagienne, après

coloration sur des appareils BenchMark IHC/ISH.

Le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est indiqué pour faciliter l'évaluation des patientes pour lesquelles Herceptin (trastuzumab) est envisagé. Ce produit doit être interprété par un anatomopathologiste qualifié, en complément d'examen histologiques, d'informations cliniques pertinentes et de contrôles adaptés.

Ce produit est conçu pour une utilisation en diagnostic in vitro (IVD).

RESUME ET EXPLICATION

Le récepteur 2 de l'récepteur du facteur de croissance épidermique humain (*HER2*) appartient à la sous-famille des récepteurs de l'récepteur du facteur de croissance épidermique de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, des récepteurs impliqués dans la croissance, la différenciation et la survie des cellules.^{1,2} Environ 15 à 30 pour cent des carcinomes mammaires présentent une surexpression de la protéine *HER2*, une amplification du gène *HER2* (*ERBB2*) ou ces deux phénomènes à la fois.^{3,4} La connaissance du statut du gène *HER2* et/ou de la protéine *HER2* chez les patientes atteintes de carcinome invasif du sein permet aux médecins de prendre des décisions plus informées afin d'améliorer la prise en charge globale de ces patientes.⁵ Le statut *HER2* est un facteur prédictif établi de la réponse aux traitements ciblant *HER2* chez les patientes atteintes de cancer du sein.^{5,6,7}

Le trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de *HER2* et s'est révélé bénéfique pour les patientes atteintes d'un cancer du sein positif à *HER2*.⁸⁻¹³ La mise en évidence d'une amplification du gène *HER2* et/ou d'une surexpression de la protéine est essentielle pour sélectionner les patientes devant recevoir un traitement par trastuzumab.^{5,14}

De même, l'amplification du gène ou la surexpression de la protéine *HER2* se produit dans l'adénocarcinome gastrique et l'adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne (collectivement appelé adénocarcinome gastro-œsophagien ou GEA).^{15,16,17} Une large fourchette de fréquences de surexpression du gène *HER2* a été rapportée dans les études publiées. Toutefois, l'un des plus grands ensembles de données de dépistage, qui comprenait 3803 patients atteints de GEA, a rapporté que 22 % des patients étaient positifs à l'expression de la protéine *HER2* ou à l'amplification génique.¹⁸ La majorité des études suggèrent qu'en l'absence de thérapie dirigée contre *HER2*, la surexpression du gène *HER2* est un facteur de pronostic négatif.¹⁹

La thérapie par trastuzumab ciblant *HER2* est un pilier de la prise en charge du carcinome invasif du sein et présente un intérêt thérapeutique dans la prise en charge des patients atteints de cancer gastrique/GEA surexprimant le récepteur.^{15,17} La mise en évidence d'une amplification du gène *HER2* et/ou d'une surexpression de la protéine est essentielle pour sélectionner les patients à traiter par trastuzumab.^{15,19} Les études cliniques ont montré que les patientes atteintes de cancer du sein ou de cancer gastrique présentant

une forte surexpression de la protéine *HER2* et/ou une amplification du gène bénéficiaient le plus du trastuzumab.^{3,15}

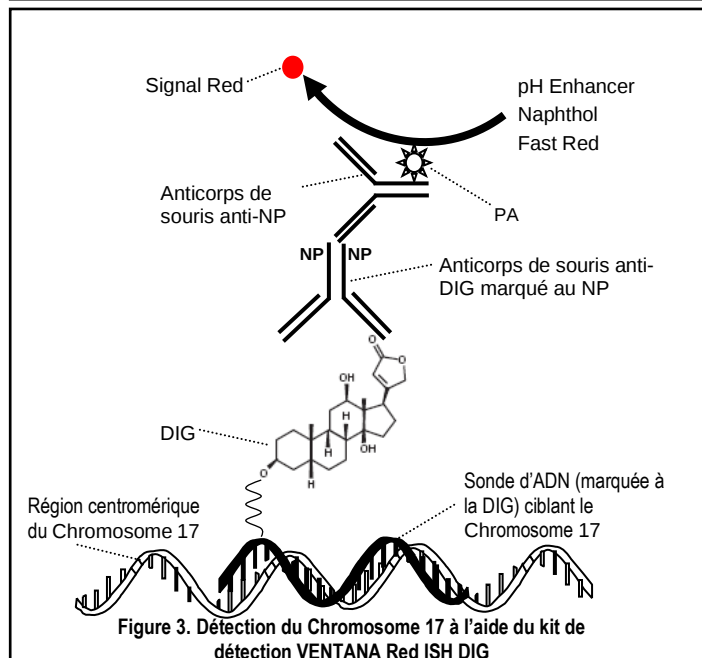
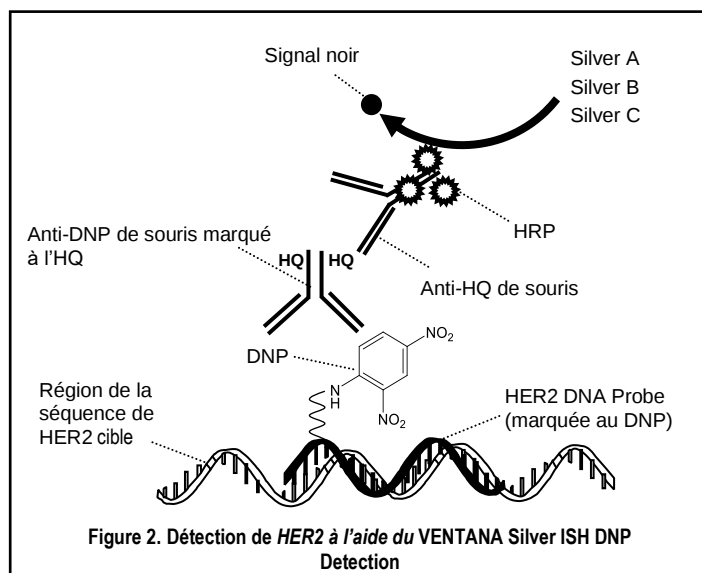
PRINCIPE DE LA PROCEDURE

Le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient des sondes ciblant *HER2* (marquées avec un haptène, le dinitrophényl ou DNP) et des sondes ciblant le Chromosome 17 (marquées avec un autre haptène, la digoxigénine ou DIG) en solution dans un tampon à base de formamide. Les sondes sont conçues pour détecter l'amplification du gène *HER2* dans le carcinome invasif du sein et la GEA. La *HER2* DNA Probe est un mélange de sondes oligonucléotidiques ciblant spécifiquement le gène *HER2* (également appelé *ERBB2* et *NEU*) qui est localisé sur le Chromosome 17 humain (17q12). La sonde du chromosome 17 est un mélange de sondes oligonucléotidiques qui ciblent des séquences comprises dans la région centromérique du chromosome 17 et qui sert de référence pour l'aneusomie. Les nombres de copies des deux sondes présentes dans le noyau des cellules tumorales sont dénombrés et les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport *HER2*/Chromosome 17 afin de déterminer le statut quant à l'amplification du gène *HER2* (un rapport *HER2*/Chromosome 17 ≥ 2.0 indique que *HER2* est amplifié, alors qu'un rapport < 2.0 indique que *HER2* n'est pas amplifié). Le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est optimisé pour une utilisation avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit et les réactifs accessoires sur un appareil BenchMark IHC/ISH.

Ce kit de détection contient un anticorps primaire et un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) ou à la phosphatase alcaline (PA), qui est utilisée comme enzyme chromogène. Lors de la procédure Dual d'hybridation in situ (Dual ISH), les sondes marquées au DNP et à la DIG sont co-hybridées à leurs séquences d'ADN cibles respectives dans les noyaux cellulaires. La détection de la sonde *HER2* marquée au DNP se fait en premier à l'aide du VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit, qui contient les distributeurs suivants : anticorps primaire anti-DNP de souris marqué à l'hydroxyquinoxaline (HQ), anticorps secondaire anti-HQ de souris conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), Chromogène A (Silver A), Chromogène B (Silver B) et Chromogène C (Silver C). Après incubation avec l'anticorps primaire anti-DNP de souris marqué à l'HQ, puis avec le conjugué anticorps secondaire anti-HQ de souris conjugué à la HRP, la réaction SISH se produit. En bref, cette réaction est induite par l'addition séquentielle des chromogènes A (acétate d'argent), B (hydroquinone) et C (H_2O_2). Les ions argent (Ag^+) sont réduits par l'hydroquinone en atomes d'argent métalliques (Ag^0). Cette réaction est alimentée par le substrat de l'HRP, à savoir le peroxyde d'hydrogène (Chromogène C). Le précipité d'argent se dépose dans le noyau, et une copie unique du gène *HER2* est visualisée par un point noir. La Figure 2 illustre la réaction de SISH.

Après la détection du gène *HER2* par la réaction de SISH, la sonde ciblant le Chromosome 17 marquée à la DIG est détectée avec le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Ce kit comprend les distributeurs suivants : anticorps primaire anti-DIG de souris marqué au nitropyrazole (NP), anticorps secondaire anti-NP de souris conjugué à la phosphatase alcaline (PA), pH Enhancer, Naphthol et Fast Red. Après le développement du signal de SISH, la lame est incubée avec l'anticorps primaire anti-DIG de souris marqué au NP qui se lie à l'haptène DIG sur la sonde ciblant le chromosome 17. L'anticorps primaire antihaptène est détecté à l'aide de l'anticorps de souris anti-NP conjugué à l'enzyme PA. La lame est incubée avec la solution de pH Enhancer qui contient les sels nécessaires aux concentrations appropriées et qui est tamponnée au pH adéquat pour assurer une activité optimale de la PA. Du phosphate de naphthol est ensuite appliqué, lequel sert de substrat à l'enzyme PA (la PA déphosphoryle le naphthol). Le Fast Red, qui est ensuite ajouté à la lame, s'associe avec le naphthol déphosphorylé pour former un précipité rouge facilement visible en microscopie optique. La réaction de Red ISH est illustrée dans la Figure 3. L'échantillon est ensuite contre-coloré à l'Hematoxylin II pour l'interprétation par microscopie optique.

Le protocole de coloration est constitué de nombreuses étapes durant lesquelles les réactifs sont incubés pendant des durées prédéterminées à des températures spécifiques. À la fin de chaque étape d'incubation, l'appareil BenchMark IHC/ISH rince les coupes pour éliminer les substances non liées et applique une solution de Liquid Coverslip pour minimiser l'évaporation des réactifs aqueux de la lame. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique sous des objectifs de 20x, 40x et/ou 60x.



MATERIEL FOURNI

Le distributeur de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient suffisamment de réactif pour effectuer 30 tests.

Un distributeur de 6 mL de VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contient environ 14 µg/mL de sondes HER2 marquées au dinitrophényl (DNP) et 0.24 µg/mL de sondes Chromosome 17 marquées à la digoxigénine (DIG) en solution dans un tampon d'hybridation à base de formamide. Les deux sondes sont utilisées pour déterminer l'état du gène *HER2* (c'est-à-dire le rapport *HER2*/Chromosome 17).

Consulter les fiches techniques des kits de détection VENTANA appropriés pour une description détaillée des éléments suivants : principe de la procédure, matériels et méthodes, prélèvement et préparation des échantillons pour l'analyse, procédures de contrôle qualité, résolution des problèmes, interprétation des résultats et limites.

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

Les réactifs de coloration tels que les kits de détection et les composants accessoires VENTANA ne sont pas fournis.

Il est possible que certains produits indiqués dans la fiche technique ne soient pas disponibles dans certains pays. Contacter un représentant du service client local.

Les réactifs et le matériel suivants nécessaires pour la coloration ne sont pas fournis :

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (réf. 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (réf. 760-512 / 083188832001)
3. HybReady Solution (réf. 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (réf. 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (réf. 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (réf. 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (réf. 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (réf. 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (réf. 950-102 / 05279771001)
10. *ultraView* Silver Wash II (Pre-dilute) (réf. 780-003 / 05446724001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (réf. 950-124 / 05279801001)
12. Cell Conditioning Solution (CC2) (réf. 950-123 / 05279798001)
13. LCS (Predilute) (réf. 650-010 / 05264839001)
14. ULTRA LCS (Pre-dilute) (réf. 650-210 / 05424534001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (réf. 950-224 / 05424569001)
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (réf. 950-223 / 05424542001)
17. Appareil BenchMark IHC/ISH
18. Lames histologiques chargées positivement (Superfrost Plus ou des lames équivalentes)
19. Milieu de montage permanent*
20. Lamelles couvre-objet d'une taille suffisante pour recouvrir le tissu.
21. Colleuse de lamelles automatisée
22. Les HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (réf. 783-4422 / 05640300001) peuvent être utilisées pour résoudre des problèmes.

* Voir le Tableau 30 pour les milieux de montage compatibles avec ce test.

CONSERVATION ET STABILITE

Conserver le produit entre 2 et 8 °C dès réception et lorsqu'il n'est pas utilisé. Ne pas congeler.

Pour assurer une distribution correcte du réactif et la stabilité de la sonde, remettre le capuchon sur le distributeur après chaque utilisation et ranger immédiatement celui-ci en position verticale dans le réfrigérateur.

Chaque distributeur de sonde comporte une date d'expiration. Lorsqu'il est correctement conservé, le réactif reste stable jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date d'expiration.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) selon les techniques habituelles sont appropriés pour une utilisation avec cette sonde sur un appareil BenchMark IHC/ISH. Il est recommandé de fixer les tissus au formol neutre tamponné (NBF) à 10 % pendant 6 à 72 heures.²⁰ Hormis les expériences avec les tests VENTANA, des études ont montré que la majorité des résultats de FISH non concluants en ce qui concerne le gène *HER2* sont associés à des facteurs pré-analytiques, en particulier une sous-fixation, une fixation excessive²¹ ou différée.²² Une application stricte des procédures de fixation (à savoir un appareil de fixation dédié de façon à assurer un minimum de six heures de fixation) a permis une réduction de 68.5 % des cas non concluants (de 10.8 à 3.4 %). Les échantillons fixés < 6 heures dans le formol peuvent entraîner une perte de signal et une surdigestion nucléaire, comme le montre la coloration pâle/faible à l'hématoxyline. Seule la fixation au NBF à 10 % est recommandée étant donné que certains fixateurs produisent des colorations variables dans les tests d'ISH (notamment le liquide de Bouin's et l'Alcool Formol-Acetic Acid [AFA]).²¹

Les lames doivent être colorées immédiatement, car la qualité des acides nucléiques cibles des coupes de tissus peut décroître avec le temps. Des études internes ont montré que les lames de coupes de tissus mammaires et gastriques conservées entre 2 et 8 °C peuvent être stables pendant 12 mois. Les conditions ambiantes peuvent affecter les lames chargées positivement et conduire à une coloration inappropriée des lames par ISH (par exemple, une coloration ou une contre-coloration insuffisante du tissu). Contacter un technicien de maintenance Roche pour obtenir un exemplaire du document « Impact of

environmental stress on various histology slide types » afin de mieux comprendre comment utiliser ces types de lames.

Chaque coupe doit avoir l'épaisseur appropriée (4 µm) pour le test utilisé et doit être placée sur une lame d'histologie chargée positivement (Superfrost Plus ou lame équivalente). Les lames doivent être égouttées ou séchées pour éliminer l'excès d'eau entre la lame et le tissu.

Les coupes d'une épaisseur supérieure à 4 µm peuvent nécessiter un traitement protéasique plus intense que le traitement recommandé et présenter plus de bulles dans les noyaux que les coupes plus fines à cause de l'excès de paraffine dans le tissu. Cela se traduit par l'apparition de petites ou de grandes bulles, ou encore de vacuoles, dans les noyaux. La formation de bulles nucléaires se traduit souvent par un spectre d'effets sur les signaux de SISH et de Red ISH caractérisés par 1) des noyaux avec des bulles d'air dans lesquels les signaux de SISH et de Red ISH sont généralement localisés au centre des noyaux et 2) des noyaux avec des bulles d'air qui repoussent les signaux de SISH et de Red ISH vers la périphérie des noyaux. Souvent, dans les deux cas, si les signaux SISH et Red ISH sont clairement discernables, ne sont pas autrement déformés, et sont encore dénombrables, le cas peut être marqué. Il peut parfois arriver en revanche que la formation de bulles nucléaires soit si sévère que les signaux de SISH et de Red ISH sont déformés ou indiscernables au point qu'une numération exacte des signaux n'est pas possible. C'est souvent le cas lorsque les signaux de SISH et de Red ISH sont repoussés à la périphérie des noyaux. Lorsque cela se produit, il est souvent possible de trouver des noyaux dans une autre partie de l'échantillon dans lesquels il est possible de compter les signaux et d'évaluer le cas. Si la présence de bulles nucléaires est sévère au point de ne pouvoir trouver suffisamment de noyaux dans lesquels les signaux de SISH et de Red ISH peuvent être comptés en toute confiance, le cas ne doit pas être évalué. Une sous-fixation des tissus (1-3 heures avec du formol) peut également être à l'origine de la formation de bulles dans les noyaux, mais de façon généralement moins discontinue. Avec une fixation de 3 heures, la coupe est récupérable en adaptant le traitement à la protéase/démassage cellulaire, mais avec un échantillon fixé seulement une heure, il n'y a rien à faire.

Le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été développé avec des options de prétraitement supplémentaires qui peuvent permettre d'optimiser le test dans différents laboratoires et pour la résolution de problèmes éventuels rencontrés avec des échantillons particuliers ou des lames présentant des colorations sous-optimales. Il est recommandé que chaque laboratoire effectue des cycles initiaux sur des échantillons de contrôle représentatifs qui ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons cliniques à tester. Cela facilite l'optimisation des conditions de coloration spécifiques pour les laboratoires individuels dont les procédures de préparation des échantillons peuvent varier. Des facteurs pré-analytiques autres que ceux recommandés risquent d'engendrer des résultats différents de ceux attendus. Les échantillons dont la préparation avant l'analyse est réalisée dans des conditions non recommandées risquent de ne jamais être colorés de manière appropriée avec ce test.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro (IVD).
2. Pour utilisation professionnelle uniquement.
3. Ne pas utiliser au-delà du nombre de tests indiqué.
4. **Attention, ce produit contient du formamide.** Le formamide est toxique s'il est inhalé et moyennement toxique s'il est ingéré. Il irrite la peau, les yeux et les membranes muqueuses, et il est absorbé à travers la peau. Il peut nuire à l'enfant in utero. Prendre des précautions pendant la manipulation des réactifs. Utiliser des gants jetables et porter des vêtements de protection appropriés pendant la manipulation de cancérigènes présumés ou de substances toxiques.
5. Les produits d'origine humaine ou animale doivent être manipulés comme susceptibles de présenter un risque biologique et éliminés en prenant les précautions appropriées. En cas d'exposition à un tel produit, il convient de respecter les directives des autorités de santé compétentes.^{23,24}
6. Éviter tout contact des yeux et des muqueuses avec les réactifs. Si des réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau. Éviter d'inhaler les réactifs.
7. Veiller à ce que le récipient à déchets soit vide avant de démarrer un cycle sur l'appareil. En l'absence de cette précaution, le récipient à déchets peut déborder et l'utilisateur risque de glisser et de tomber.
8. Éviter toute contamination microbienne des réactifs, car cela pourrait entraîner des résultats erronés.

9. Pour plus d'informations sur l'utilisation de ce produit se référer au guide d'utilisation de l'appareil BenchMark IHC/ISH et au mode d'emploi de tous les composants nécessaires à l'adresse navifyportal.roche.com.
10. Consulter les autorités locales et/ou nationales pour connaître la méthode d'élimination recommandée.
11. L'étiquetage de sécurité des produits suit principalement les directives SGH de l'UE. La fiche de données de sécurité est disponible sur demande pour les utilisateurs professionnels.
12. Pour signaler toute suspicion d'événement grave lié à ce dispositif, contacter un représentant Roche local et l'autorité compétente de l'État membre ou du pays dans lequel le dispositif est utilisé.

Ce produit contient des composants classés comme suit conformément au Règlement (CE) N° 1272/2008 :

Tableau 1. Mentions de danger.

Danger	Code	Mention
	H351	Susceptible de provoquer le cancer.
	H360D	Peut nuire au fœtus.
	H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
	P201	Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.
	P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
	P260	Ne pas inhaler le brouillard ou les vapeurs.
	P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage/de l'ouïe.
	P308 + P313	En cas d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.
	P501	Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

Ce produit contient du formamide, numéro CAS 75-12-7

PROCEDURE DE COLORATION

Les sondes VENTANA ont été développées pour être utilisées sur un appareil BenchMark IHC/ISH en association avec les kits de détection et les accessoires VENTANA. Les procédures de coloration de l'appareil BenchMark IHC/ISH avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit se trouvent dans le Tableau 2. Les protocoles de coloration recommandés sont indiqués dans le Tableau 3.

Les paramètres des procédures automatisées peuvent être affichés, imprimés et modifiés conformément à la procédure décrite dans le guide d'utilisation de l'appareil. Consulter la fiche technique du kit de détection VENTANA approprié pour des informations plus détaillées.

Pour de plus amples informations sur l'utilisation appropriée de ce dispositif, consulter la fiche technique du distributeur en ligne associée à la référence 800-6043.

Tableau 2. Utilisez les procédures de coloration suivantes pour effectuer le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

Plateforme d'appareil	Procédure de coloration
BenchMark GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark ULTRA ou BenchMark ULTRA PLUS	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

Tableau 3. Conditions de coloration recommandées pour effectuer le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

Condition de coloration	Sein	Estomac
Séchage	Non sélectionné	Non sélectionné
Cell Conditioning 1	16 min	16 min
Cell Conditioning 2	24 min	16 min
ISH Protease 3	20 min	16 min
Température de lavage stringent	76 °C pour les appareils BenchMark GX/XT	76 °C pour les appareils BenchMark GX/XT
	74 °C pour les appareils BenchMark ULTRA ou ULTRA PLUS	74 °C pour les appareils BenchMark ULTRA ou ULTRA PLUS

En raison d'une certaine variabilité de la fixation et de la préparation des tissus ainsi que des conditions générales ambiantes du laboratoire et des appareils utilisés, il peut être nécessaire d'augmenter ou de diminuer la durée du démasquage cellulaire ou du prétraitement à la protéase en fonction des échantillons utilisés.

Démarrer un cycle sur les appareils BenchMark IHC/ISH

1. Apposer l'étiquette code-barres correspondant au protocole de la sonde à exécuter sur les lames.
2. Charger le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, les réactifs des kits de détection VENTANA Red ISH DIG et VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et les réactifs accessoires nécessaires dans le ou les plateaux ou le carrousel de réactifs. Placer le ou les plateaux ou le carrousel de réactifs sur l'appareil.
3. Vérifier les réactifs génériques et les déchets.
4. Les bidons de tampons de réaction génériques doivent être pleins.
5. Le récipient à déchets doit être vide avant le démarrage du cycle.
6. Charger les lames dans l'appareil.
7. Démarrer le cycle de coloration.
8. À la fin du cycle, retirer les lames de l'appareil. Les lames colorées seront couvertes de restes de tampon et de solution de Liquid Coverslip. Procéder à leur rinçage et à leur déshydratation (voir ci-après).

Procédure de déshydratation

Remarque : Le chromogène Fast Red est soluble dans l'alcool et l'acétone. L'exposition des lames colorées à l'alcool et/ou à l'acétone peut entraîner une perte de signal spécifique.

1. Pour éliminer la solution de Liquid Coverslip, laver séquentiellement les lames dans deux solutions de liquide vaisselle doux (ne pas utiliser de détergent de lave-vaisselle).
2. Bien rincer les lames à l'eau distillée, pendant environ 1 minute. Secouer les lames pour éliminer l'excès d'eau.
3. Placer les lames dans une étuve (45-60 °C) afin de les sécher, ou les laisser sécher à l'air libre à température ambiante. Dans une étuve, le séchage prend entre 10 minutes et une heure (un séchage plus long des lames colorées ne semble pas changer les résultats de la coloration). S'assurer que les lames sont parfaitement sèches avant de mettre les lamelles, car tout résidu d'eau sur les lames peut interférer avec la procédure d'apposition des lamelles et causer la formation de bulles.
4. Transférer les lames dans un bain de xylène pendant environ 30 secondes.
5. Placer le milieu de montage sur la lame.
6. Placer la lamelle sur la lame. Noter que certains milieux de montage ne sont pas compatibles avec le test et ne doivent pas être utilisés (voir les rubriques Limites et Résolution des problèmes).

PROCÉDURES DE CONTRÔLE QUALITÉ

Échantillons de contrôle positif

Les signaux pour le gène *HER2* et le Chromosome 17 de cellules normales (une à deux copies par cellule) servent de contrôles positifs internes et doivent être visibles dans l'échantillon sous des objectifs de 20x, 40x et/ou 60x. Cependant, en raison de l'hétérogénéité biologique, toutes les cellules ne présentent pas une copie unique de

gène. Une coloration nucléaire spécifique peut être présente dans divers types cellulaires : fibroblastes du stroma, cellules endothéliales, lymphocytes et cellules épithéliales non néoplasiques. L'absence de coloration positive dans les contrôles positifs peut être l'indication d'un problème de réactif ou d'appareil. Comme tous les échantillons possèdent un contrôle positif interne (à savoir une coloration par ISH appropriée dans les cellules normales de l'échantillon), ce contrôle sert de « contrôle positif » vrai.

Un échantillon de contrôle positif spécifique au laboratoire peut être inclus à chaque procédure de coloration exécutée. Les échantillons de contrôle peuvent être des échantillons préparés dans les mêmes conditions que les échantillons des patients. De tels contrôles sont très utiles pour contrôler toutes les étapes de la procédure, de la préparation des échantillons à la coloration. Un échantillon préparé dans des conditions différentes de celles des échantillons à tester servira de contrôle pour les réactifs, l'appareil et les procédures de coloration mais pas pour la fixation et la préparation des échantillons. Les résultats des échantillons à tester doivent être analysés avec les résultats des contrôles colorés lors d'un même cycle. De tels contrôles ne doivent en aucun cas remplacer l'évaluation appropriée des contrôles internes de chaque échantillon de patient.

Échantillon de xénogreffe

Des lames d'échantillons de xénogreffe peuvent être utiles pour une validation préliminaire de la méthode utilisée pour la coloration des lames avec le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Elles sont également recommandées pour faciliter la résolution des problèmes lorsqu'elles sont incluses aux cycles comprenant des échantillons cliniques. Pour de plus amples informations, voir la fiche technique de la lame de xénogreffe appropriée.

Écarts inexplicables

Signaler immédiatement à un représentant du service client local les écarts inexplicables observés avec les contrôles. Si les résultats des contrôles qualité ne sont pas conformes aux spécifications, les résultats des patients sont non valides. Voir la rubrique Résolution des problèmes de cette fiche technique. Identifier et corriger le problème, puis répéter la coloration des échantillons des patients.

Vérification du test

Avant la première utilisation d'une sonde ou d'un système de coloration dans une procédure de diagnostic, la spécificité de la sonde doit être vérifiée en la testant sur une série de tissus aux caractéristiques de performances d'ISH connues (consulter la fiche technique des sondes, les recommandations pour les contrôles qualité du College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²⁵ ou des directives CLSI Approved Guideline²⁶ ou de ces deux documents). Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot de réactifs, ou chaque fois que les paramètres du test sont modifiés.

INTERPRÉTATION DE LA COLORATION/RÉSULTATS ATTENDUS

Le profil de coloration cellulaire obtenu avec le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail est nucléaire.

Un anatomopathologiste qualifié expert en interprétation microscopique des échantillons d'anatomopathologie, en procédures d'ISH et en reconnaissance des copies du Chromosome 17 (Chr17) et des copies uniques et amplifiées du gène *HER2* (qui nécessite un examen microscopique avec des objectifs de 20x, 40x et/ou 60x) doit évaluer les contrôles avant d'interpréter les résultats.

Remarque : l'utilisation d'un objectif de 100x n'est pas recommandée. Toutes les lames de tissus lues durant les tests de vérification et de validation de la conception du test l'ont été avec des objectifs de 20x, 40x et/ou 60x.

Pour l'évaluation des lames, le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail doit être utilisé conjointement au *guide d'interprétation* du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail [réf. 1018386].

Les sections suivantes décrivent comment interpréter et noter les lames. Le Tableau 4 illustre comment compter les signaux isolés.

Définitions

1. Statut du gène *HER2*. Le statut du gène *HER2* dépend du rapport entre le nombre de copies du gène *HER2* et le nombre de copies du Chr17 par cellule de carcinome invasif du sein ou de GEA. Le statut du gène *HER2* est classé selon les directives suivantes :
 - a. Rapport *HER2*/Chr17 ≥ 2.0 : *HER2* est amplifié
 - b. Rapport *HER2*/Chr17 < 2.0 : *HER2* est non amplifié
2. Adéquation des lames. Une lame colorée avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail doit satisfaire trois critères pour être considérée adéquate pour la

numération. Si la lame ne remplit pas ces critères, les signaux de la lame ne peuvent pas être comptés et le résultat est insatisfaisant.

- Contrôles positifs internes Les signaux pour le gène *HER2* et le Chr17 de cellules normales (une à deux copies par cellule) servent de contrôles positifs internes et doivent être visibles dans l'échantillon. Cette coloration nucléaire peut être présente dans divers types cellulaires non néoplasiques : fibroblastes du stroma, cellules endothéliales, lymphocytes et cellules épithéliales non néoplasiques, par exemple.
 - Cellules néoplasiques. Sous des objectifs de 20x, 40x et/ou 60x, l'aspect invasif de la tumeur doit présenter un champ de signaux de SISH et de Red ISH dénombrables.
 - Bruit de fond. Tout bruit de fond de coloration généré par les systèmes de détection de la SISH ou de la Red ISH doit être évalué afin de déterminer s'il interfère avec la numération des signaux de SISH et de Red ISH spécifiques. Le bruit de fond SISH apparaît généralement sous la forme d'une « poussière » SISH qui se distingue du signal spécifique. Le bruit de fond de Red ISH peut avoir l'aspect d'un voile rouge ou, plus rarement, de signaux d'intensité plus faible que celle des signaux spécifiques.
- Zones cibles pour la numération des signaux. Une zone cible acceptable du carcinome invasif doit présenter un champ de signaux de SISH et de Red ISH dénombrables. La numération des signaux ne doit pas se faire dans les zones comprenant des signaux de SISH et de Red ISH de faible intensité, dans les noyaux comprimés ou se chevauchant ou au niveau des nécroses. Si une zone cible est jugée inadéquate pour la numération, il est souvent possible de trouver d'autres zones cibles sur la même lame qui sont adéquates. L'adéquation de ces zones peut être déterminée par la présence de cellules normales avec une coloration par SISH et Red ISH appropriée dans la zone cible ou à côté de celle-ci.

Observations supplémentaires pour *HER2* et le Chromosome 17

L'anatomopathologiste peut ajouter d'autres observations à son compte rendu sous forme de commentaires.

- Hétérogénéité : Dans certains cas, le tissu peut contenir des zones de carcinome qui sont génétiquement hétérogènes quant au nombre de copies de *HER2* (il peut y avoir un mélange de noyaux avec le gène *HER2* amplifié et de noyaux avec le gène non amplifié ou un mélange de noyaux contenant différents nombres de copies du gène). Ce phénomène peut être observé parmi les cellules carcinomateuses dans la zone cible elle-même, ou entre deux zones cibles différentes.
- L'aneusomie désigne une situation dans laquelle un organisme possède un nombre supérieur ou inférieur à la normale de chromosomes spécifiques. En d'autres termes, le nombre d'un chromosome particulier (dans ce cas, le Chromosome 17) n'est pas diploïde. Dans le cas de la polysomie, il peut y avoir trois copies ou plus du chromosome au lieu des deux copies attendues. Dans le cas d'une monosomie, les cellules tumorales ne possèdent qu'une seule copie du Chromosome 17. Des amas apparemment « d'amplification » ou une polysomie du Chromosome 17 (avec ou sans amas de signaux de SISH pour *HER2*) ont été décrits.²⁷ En cas d'amas pour *HER2* et le Chromosome 17, il faut veiller à ne pas les prendre en compte si leur rapport est de ~ 1.0. Le lecteur doit se référer aux résultats de l'immunohistochimie (IHC) pour les analyses de surexpression de la protéine *HER2* dans ces cas, car la majorité tend à être 3+.
- Délétion monoallélique : La délétion du gène *HER2* du Chromosome 17 dans les cellules tumorales donne un rapport *HER2*/Chr17 < 1.0.

Visualisation des signaux

Les signaux de SISH et de Red ISH, visualisés sous forme de, respectivement, points noirs et points rouges, représentent les nombres de copies suivants :

- Copie unique. Un point noir isolé (SISH) est compté comme une copie unique de *HER2*. Les points noirs isolés des signaux de SISH présents dans les noyaux (non néoplasiques) de contrôle interne représentent la taille d'une copie unique dans les cellules de carcinome invasif. Pour les signaux de Red ISH, chaque point rouge isolé est compté comme une seule copie. Noter que le point rouge du signal de Red ISH sur le Chr17 peut paraître plus gros que les points noirs des signaux de SISH et est parfois de forme allongée. Un voile rose est parfois présent et ne doit pas être confondu avec un signal. Les points des signaux Red qui sont très pâles par rapport aux points des signaux rouges des noyaux de contrôle positif interne et au profil de coloration général ne doivent pas être comptés car ils peuvent ne pas être spécifiques. Les points des signaux rouges possèdent un contour bien défini, tel qu'illustré dans le Tableau 4.

- Copies multiples. Les points isolés des signaux de SISH présents dans les noyaux de contrôle positif interne représentent la taille d'une copie unique du gène *HER2* dans les cellules de carcinome invasif. La taille des points isolés des signaux de SISH sert de référence pour déterminer le nombre relatif de copies amplifiées dans les noyaux des cellules cancéreuses. Pour les signaux de Red ISH, chaque point rouge isolé est compté comme une seule copie.
- Amas. Lorsque plusieurs points présents dans un noyau se chevauchent, ils ne peuvent pas être dénombrés. Un amas est défini comme plusieurs points de signaux de SISH dans un noyau qui ne peuvent pas être individuellement discernés. Les amas de copies du gène *HER2* peuvent uniquement être estimés par le lecteur. Par exemple, il peut estimer qu'un gros amas de plusieurs points de signaux de SISH représente 12 copies et qu'un petit amas représente 6 copies. L'estimation se fait en utilisant les copies uniques détectées par SISH dans les cellules de contrôle positif interne comme référence. La présence d'amas de *HER2* est notée sur la fiche d'évaluation.
- Les signaux des noyaux qui se chevauchent, des noyaux avec seulement une couleur et des échantillons avec une coloration non spécifique ne doivent pas être comptés. Les deux signaux des noyaux avec des points de signaux de SISH et Red ISH se chevauchant qui ne peuvent pas être discernés les uns des autres sans être observés à un grossissement plus fort ne doivent pas être comptés. Les signaux des noyaux présentant des bulles ne doivent pas être comptés.

Comptage des signaux SISH et Red ISH pour déterminer le statut du gène *HER2*

Examiner la lame colorée au H&E et repérez les zones contenant du tissu de carcinome invasif du sein ou de carcinome gastro-œsophagien. Examiner la lame marquée par *HER2* Dual ISH correspondant à la lame colorée par H&E, et repérer une zone cible du tissu de carcinome invasif du sein ou de carcinome gastro-œsophagien. Avant de compter les signaux correspondant à *HER2* et au chromosome 17 pour déterminer le statut du gène *HER2*, il est très important de déterminer si la zone cible de cancer invasif (le tissu lésionnel) est adéquatement colorée et si elle remplit les critères décrits pour l'adéquation des lames (voir le paragraphe 2 Adéquation des lames de la rubrique Définitions plus haut. Adéquation des lames).

L'algorithme de notation développé pour le test maximise la précision et l'efficacité du comptage. Les signaux de vingt noyaux en tout, contenant chacun des signaux rouges (Red ISH) et des signaux noirs (SISH), doivent être comptés.

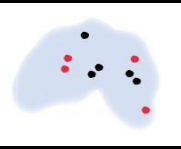
Critères de sélection des cellules

Ne compter les signaux que des noyaux dont le diamètre est représentatif du diamètre moyen de la population des noyaux de cellules de carcinome invasif dans la zone cible. Ne pas compter les signaux dans les noyaux qui ont :

- Un diamètre très supérieur au diamètre moyen des noyaux de cellules de carcinome
 - Un diamètre très inférieur au diamètre moyen des noyaux de cellules de carcinome
- Ne compter les signaux que des noyaux qui sont représentatifs de la population des noyaux de cellules de carcinome invasif comprenant le plus grand nombre moyen de signaux (SISH et Red ISH).

Dans les zones cibles qui sont génétiquement hétérogènes quant au nombre de copies de *HER2*, ne compter les signaux que des noyaux qui sont représentatifs de la population des noyaux de cellules de carcinome invasif comprenant le plus grand nombre moyen de signaux (SISH et Red ISH). Il est à noter que l'hétérogénéité est présente sur la fiche d'évaluation.

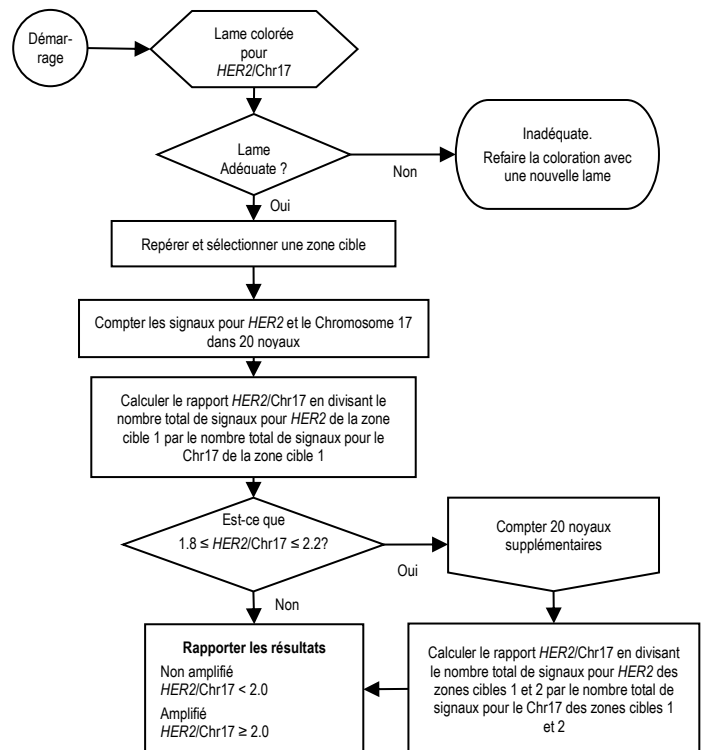
Tableau 4. Visualisation des signaux.

	Ne pas compter si les noyaux se chevauchent.
	Ne pas compter s'il n'y a aucun signal.
	Ne pas compter s'il n'y a qu'un signal d'une seule couleur.

	Ne pas compter si les signaux se trouvent à l'extérieur du noyau.
	Compter 1 signal noir (HER2) et 1 signal rouge (Chr17).
	Compter 2 signaux noirs (HER2) et 2 signaux rouges (Chr17).
	Compter 1 signal noir (HER2) et 2 signaux rouges (Chr17). Le signal noir est un « doublet ». Ne compter deux signaux adjacents de la même couleur que si la distance entre les points est égale ou supérieure au diamètre d'un seul point.
	Les petits amas de signaux de SISH ne peuvent être estimés qu'en utilisant la taille d'un point isolé comme référence. Utiliser les cellules stromales (la plus petite cellule sur le schéma) pour estimer la taille des points des signaux. Par exemple, on peut estimer que cet amas représente 6 signaux de SISH, l'ajout des 2 autres signaux donne un total de 8. Compter 2 signaux rouges. Noter sur la fiche d'évaluation que des amas sont présents pour HER2.
	Estimer le gros amas. Dans ce cas, on peut estimer que l'amas représente 12 signaux noirs. L'ajout des 4 autres signaux donne un total de 16. Considérer que les signaux rouges représentent 2 copies du Chr17. Noter sur la fiche d'évaluation que des amas sont présents pour HER2.
	Un point rouge à proximité d'un point noir doit être compté comme un signal rouge et un signal noir. Un objectif de 60x sera peut-être nécessaire pour pouvoir discerner ces points l'un de l'autre. Donc, dans ce cas, il faut compter un total de 4 signaux noirs (HER2) et de 2 signaux rouges (Chr17). S'il n'est pas possible de discerner l'un de l'autre les points des signaux qui se chevauchent, ne pas compter les signaux de ce noyau.
	Amas de points noirs masquant le ou les signaux rouges. Essayer un grossissement plus fort (60x) pour confirmer la présence ou l'absence d'un ou plusieurs signaux rouges. Si la confirmation n'est pas concluante, ne pas compter les signaux. Ne compter les signaux que des noyaux dont les signaux rouges sont clairement visibles. Noter la présence des amas de signaux de SISH sur la fiche d'évaluation. Les noyaux avec des amas de signaux de SISH et un plus grand nombre de signaux rouges visibles doivent être évalués.
	Si le noyau présente un bruit de fond de SISH à l'aspect de « poussières », ne compter les signaux de SISH que s'ils sont clairement discernables du bruit de fond.
	Un voile rose est parfois présent et ne doit pas être confondu avec un signal. Des signaux de Red ISH ayant l'aspect de petits points rouge pâle sont parfois observés et peuvent représenter des liaisons non spécifiques de la sonde du Chr17 à d'autres chromosomes. L'image comprend 2 signaux rouges isolés (Chr17) et 2 signaux noirs isolés (HER2).

Statut du gène HER2 : Algorithme de notation du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

Les signaux d'un total de vingt noyaux (contenant chacun des signaux rouges [Chr17] et des signaux noirs [HER2]) doivent être comptés. Le résultat final pour le statut HER2 est déduit en fonction du rapport calculé par division de la somme des signaux pour HER2 de l'ensemble des 20 noyaux par la somme des signaux pour le Chromosome 17 de l'ensemble des mêmes 20 noyaux. Le statut d'amplification est défini comme amplifié pour un rapport $HER2/Chr17 \geq 2.0$ et comme non amplifié pour un rapport $HER2/Chr17 < 2.0$. Si le rapport $HER2/Chr17$ est compris entre 1.8 et 2.2, les signaux de 20 noyaux supplémentaires doivent être comptés. Un nouveau rapport doit alors être calculé à partir de l'ensemble des 40 noyaux, et le statut d'amplification déduit de la façon décrite ci-dessus.



Contrôles

Les cellules normales à l'intérieur de la zone cible ou adjacentes à celle-ci servent de contrôles internes de coloration. Au moins 50 % des noyaux de cellules normales doivent contenir au moins un signal de SISH et au moins 50 % des noyaux de cellules normales doivent contenir au moins un signal de Red ISH (les signaux de SISH et de Red ISH ne doivent pas nécessairement être présents dans les mêmes cellules) pour que la zone cible soit considérée adéquate. La détection d'aucun signal adéquat dans les cellules normales d'une lame d'un cycle indique que cette lame est inadéquate pour la numération. L'utilisation d'échantillons de contrôle positif ou de lames de xénogreffes permet de résoudre les problèmes potentiels associés à l'appareil et/ou aux réactifs.

LIMITES

Limites générales

1. L'ISH est une méthode à plusieurs étapes nécessitant une formation spécialisée pour le choix des réactifs appropriés, la préparation des échantillons, le traitement, la préparation des lames d'ISH et pour l'interprétation des résultats.
2. La coloration des tissus dépend de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. La fixation, la congélation, la décongélation, le rinçage, le séchage, le chauffage ou la coupe inconvenable, ou une contamination par d'autres tissus ou liquides, peuvent entraîner des artefacts, un piégeage des réactifs, des résultats faux négatifs ou faux positifs. Des résultats incohérents peuvent être la

conséquence de variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion ou d'irrégularités inhérentes au tissu.

- Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre l'interprétation correcte des résultats.
- L'interprétation clinique de la coloration doit être évaluée dans le contexte des antécédents cliniques, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. Il est de la responsabilité d'un anatomopathologiste qualifié de se familiariser avec les réactifs et les méthodes utilisés pour produire la préparation colorée. La coloration doit être réalisée dans un laboratoire autorisé et accrédité, sous le contrôle d'un anatomopathologiste responsable de l'examen des lames colorées et de l'adéquation des contrôles.
- Les réactifs VENTANA sont fournis à la dilution optimale pour une utilisation conforme aux instructions fournies. Tout écart par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients.
- En raison d'une certaine variabilité de la préparation des échantillons, il peut être nécessaire d'augmenter ou de diminuer la durée du traitement à la protéase pour l'ISH. L'augmentation ou la réduction du démasquage cellulaire a aussi des répercussions sur les résultats de la coloration. Ces modifications doivent être validées par l'utilisateur. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients dans ces circonstances.
- Les réactifs peuvent produire des réactions inattendues sur des tissus qui n'ont pas été testés auparavant. La possibilité de réactions inattendues, même dans des groupes de tissus déjà testés, ne peut être complètement exclue en raison de la variabilité biologique des tissus. Contacter un représentant du service client local avec les réactions inattendues documentées.

LIMITES SPECIFIQUES

- Tous les fixateurs ne sont pas compatibles avec ce test. Il est recommandé de fixer les tissus au NBF à 10 % pendant 6 à 72 heures.
- Le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été développé pour colorer des coupes de tissu d'une épaisseur de ~ 4 µm.²⁰ Les coupes d'une épaisseur supérieure à 4 µm risquent une perte de tissu.
- Tous les tests ne sont pas forcément enregistrés sur chaque appareil. Un représentant du service client local pourra vous fournir plus d'informations.
- L'oxydation, l'atténuation et/ou la disparition du signal de SISH sont possibles avec les milieux de montage de certaines marques. Les milieux de montage compatibles sont indiqués dans le Tableau 30.
- Pour prévenir la dissolution du signal de Red ISH, les lames colorées ne doivent pas être immergées dans des bains d'alcool ou d'acétone pour l'étape de déshydratation. Il est recommandé de les laisser sécher à l'air libre ou de les faire sécher dans une étuve. Les lames colorées doivent être parfaitement sèches avant l'apposition des lamelles.
- Comme pour tout test, un résultat négatif indique uniquement que la cible spécifique n'a pas été détectée, pas qu'elle est absente des cellules ou du tissu testés.
- Cette sonde a été optimisée pour une utilisation avec les réactifs VENTANA sur les appareils BenchMark IHC/ISH. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent assumer la responsabilité de l'interprétation des résultats des patients dans ces circonstances.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Les performances du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ont été évaluées par des études cliniques et analytiques. Sauf mention contraire, toutes les colorations ont été réalisées selon le protocole du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail tel qu'indiqué dans le Tableau 3 sur des appareils BenchMark IHC/ISH.

Le Tableau 5 et le Tableau 6 résument les données de performance dans l'ensemble de ces études : études de concordance, de répétabilité et de précision, de précisions intralecteur et interlecteurs, de précision interlots, de précision interlaboratoires de l'appareil, de sensibilité et de spécificité analytiques, de caractérisation du test et de stabilité. Un sous-ensemble de ces études est décrit plus en détail dans les sections suivantes.

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus pour la performance du test pour le carcinome mammaire dans les différentes études cliniques et analytiques.

Con-cluant	Non con-cluant	Total	Causes d'un test non concluant			
			Faible/aucun signal HER2/Chr17 (contrôle interne ou cellules cibles)	Bruit de fond non adéquat	Aucun tissu	Autre
2893	127	3020	113 (3.74 %)	5 (0.17 %)	6 (0.20 %)	3 (0.10 %)

Tableau 6. Synthèse des résultats obtenus pour la performance du test sur du tissu gastrique dans les différentes études cliniques et analytiques.

Con-cluant	Non con-cluant	Total	Causes d'un test non concluant			
			Faible/aucun signal HER2/Chr17 (contrôle interne ou cellules cibles)	Bruit de fond non adéquat	Aucun tissu	Autre
1340	17	1357	17 (1.25 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

PERFORMANCES CLINIQUES

Étude de la concordance avec le test PathVysion : Comparaison entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur l'appareil BenchMark ULTRA et l'Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Une étude de concordance multicentrique a été réalisée pour évaluer la concordance du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail avec le dispositif de comparaison, l'Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit, dans la détermination de l'état du gène *HER2* dans le carcinome invasif du sein. Trois laboratoires centraux ont participé au test du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Six cent trente-six cas de carcinome invasif du sein humain de trois centres de recrutement cliniques ont été fournis en vue de leur inclusion potentielle à l'étude en fonction leur niveau d'expression de la protéine *HER2* déterminé antérieurement par IHC. Le commanditaire de l'étude a fourni 133 cas supplémentaires. Les laboratoires centraux qui réalisaient les tests VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et PathVysion HER-2 FISH n'avaient pas connaissance du statut d'IHC et de l'identifiant original des cas afin d'éviter tout biais dans l'évaluation des échantillons. Un laboratoire central a réalisé la coloration par IHC de tous les échantillons en utilisant le PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticorps PATHWAY anti-HER2 [4B5]) pour les analyses complémentaires. Les résultats des colorations des tests FISH et VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ont été dénombrés en comptant au moins 20 noyaux dans chaque échantillon. Pour les résultats, *HER2* était considéré amplifié pour un rapport *HER2/Chr 17* ≥ 2.0 , et *HER2* était considéré non amplifié pour un rapport *HER2/Chr 17* < 2.0 . Sur les 678 cas colorés avec les deux tests (FISH et VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail), 605 échantillons présentaient des signaux dénombrables avec les deux tests et ont donc été inclus à l'analyse des taux de concordance.

Résultats primaires

L'analyse principale a consisté à comparer les taux de concordance négative et les taux de concordance positive entre les tests VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et PathVysion HER-2 FISH pour le carcinome mammaire. Les données relatives aux évaluations cliniques amplifiées et non amplifiées pour chaque test, regroupant les données de tous les sites, sont présentées dans un tableau 2x2 ci-dessous, ainsi que les taux de concordance positifs en pourcentage et négatifs en pourcentage, PathVysion HER-2 FISH étant le test de référence. Les critères d'acceptation pour démontrer une performance équivalente de ces deux méthodes de test lors de l'utilisation de l'appareil

BenchMark ULTRA exigeaient que les bornes inférieures de l'intervalle de confiance du score bilatéral à 95 % soient égales ou supérieures à 85 % lors de la mise en commun des données des trois sites. Ces critères d'acceptation ont été remplis (Tableau 7). En outre, les taux de concordance positive et négative pour chaque centre étaient tous supérieurs à 85 % (Tableau 8).

Tableau 7. Concordance entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et l'Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur une cohorte d'échantillons de carcinome mammaire humain.

Résultat avec VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Résultat avec PathVysion HER-2 FISH		
	Amplifié	Non amplifié	Total
Amplifié	270	12	282
Non amplifié	32	291	323
Total	302	303	605
	n/N	% (CI à 95 %)	
Taux de concordance positive	270/302	89.4 (85.4, 92.4)	
Taux de concordance négative	291/303	96.0 (93.2, 97.7)	

Tableau 8. Synthèse des taux de concordance négative, de concordance pour les positifs et de concordance globale entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et l'Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit sur des échantillons de carcinome mammaire humains présentés par centre.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail vs PathVysion HER-2 FISH	Taux de concordance positive	Taux de concordance négative	Taux de concordance globale
Centre A : n/N (%) (CI à 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)
Centre B : n/N (%) (CI à 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)
Centre C : n/N (%) (CI à 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)

Ces données indiquent une excellente concordance entre le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le PathVysion HER-2 FISH Kit quant à la détermination du statut du gène *HER2* dans des échantillons de carcinome du sein humain.

Résultats secondaires

Le taux de concordance globale entre le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le PathVysion HER-2 FISH Kit et son CI bilatéral à 95 %, pour l'ensemble des données de tous les centres, était de 92.7 % (90.4, 94.5).

Résultats secondaires : IHC vs ISH pour le statut HER2

L'étude de la concordance entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le kit PathVysion FISH a également été conçue pour évaluer les cas en fonction de leurs scores à l'IHC pour les niveaux de protéine HER2 (voir la fiche technique de l'anticorps PATHWAY anti-HER2 [4B5] [réf. 14427EN] pour l'évaluation de l'IHC). Une analyse secondaire a ainsi permis de comparer les taux de concordance entre l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (4B5) et le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, ainsi qu'entre l'anticorps PATHWAY anti-HER2 (4B5) et le test PathVysion FISH. Dans cette étude, les scores IHC de 2+/3+ ont été considérés comme positifs pour la surexpression du gène HER2. Les données sur la concordance entre le test PathVysion HER-2 FISH et l'anticorps PATHWAY HER2/neu (4B5) se trouvent dans le Tableau 9. Les

données sur la concordance entre le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et l'anticorps PATHWAY HER2/neu (4B5) se trouvent dans le Tableau 10.

Tableau 9. Comparaison entre l'IHC sur l'appareil BenchMark ULTRA et la méthode FISH : ensemble des données de tous les centres.

		Résultat avec PathVysion HER-2 FISH		
		Amplifié	Non amplifié	Total
Résultat avec l'anticorps PATHWAY HER2 (4B5)	Positif (cas 2+/3+)	277	63	340
	Négatif (0/1+)	27	238	265
	Total	304	301	605
	n/N	% (CI à 95 %)		
Taux de concordance positive	277/304	91.1 (87.4, 93.8)		

Tableau 10. Comparaison entre l'IHC sur l'appareil BenchMark ULTRA et le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail : ensemble des données de tous les centres.

		Résultat avec VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail		
		Amplifié	Non amplifié	Total
Résultat avec l'anticorps PATHWAY HER2 (4B5)	Positif (cas 2+/3+)	248	78	326
	Négatif (0/1+)	18	253	271
	Total	266	331	597
	n/N	% (CI à 95 %)		
Taux de concordance positive	248/266	93.2 (89.6, 95.7)		

Étude de concordance : Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur l'appareil BenchMark ULTRA vs test Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

Une étude de concordance a été réalisée pour évaluer la concordance entre les résultats obtenus avec le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et ceux obtenus avec le Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit, un kit utilisant l'hybridation in situ fluorescente (FISH), pour la détermination du statut du gène *HER2* pour les GEA. La comparabilité des tests sur des échantillons de carcinomes de l'estomac et de la jonction gastro-œsophagienne a été déterminée en comparant des résultats des colorations des deux tests (Tableau 11). Cent trente-quatre (134) échantillons d'AGO (un mélange de cas amplifiés et non amplifiés) ont été colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Les échantillons de la même cohorte ont été marqués avec le test Dako HER2 IQFISH pharmDx™. Les résultats détaillant les taux de concordance positive, de concordance pour les négatifs et de concordance globale pour les 146 échantillons de cette cohorte dont les signaux étaient dénombrables à la fois avec le test Dako HER2 IQFISH pharmDx™ et le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se trouvent dans le Tableau 11 et le Tableau 12.

Tableau 11. Concordance entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le test Dako HER2 IQFISH pharmDx™ sur une cohorte d'échantillons de GEA humains.

Statut d'amplification avec VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Statut d'amplification avec le test Dako HER2 IQFISH pharmDx™	
	Amp	Non amp
Amp	49	8
Non amp	5	84

Tableau 12. Synthèse des taux de concordance négative, de concordance pour les positifs et de concordance globale entre le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail et le test Dako HER2 IQFISH pharmDx™ sur des échantillons d'AGO humains.

	Négatif Taux de concordance		Positif Taux de concordance		Taux Taux de concordance	
	Données brutes/ nbre de cas	de concordance (CI à 95 %)	Données brutes/ nbre de cas	de concordance (CI à 95 %)	Données brutes/ nbre de cas	de concordance (CI à 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)

PERFORMANCES ANALYTIQUES

Répétabilité et précision des appareils BenchMark IHC/ISH pour le carcinome mammaire

La répétabilité et la précision du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ont été évaluées sur les appareils BenchMark IHC/ISH en association avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

La répétabilité intracycle a été évaluée à partir de 28 échantillons de carcinome mammaire. Deux lames par appareil de chacun des échantillons ont été colorées avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur un même appareil BenchMark ULTRA, BenchMark XT ou BenchMark GX. Pour l'analyse des données des appareils BenchMark XT et GX, les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence.

La précision intermédiaire interjournalière a également été évaluée sur des échantillons de carcinome mammaire. Deux lames par appareil de chacun des 28 échantillons ont été colorées avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur des appareils BenchMark IHC/ISH lors de 5 jours non consécutifs. Pour l'analyse des données des appareils BenchMark XT et BenchMark GX, les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence.

La répétabilité intracycle a été déterminée avec la concordance positive moyenne (APA), la concordance négative moyenne (ANA) et le taux de concordance globale (OPA). La précision intermédiaire interjournalière a été déterminée avec le taux de concordance positive (PPA), le taux de concordance négative (NPA) et le taux de concordance globale (OPA) pour toutes les observations de la population évaluable. Une synthèse des résultats des deux études se trouve dans le Tableau 13.

Tableau 13. Répétabilité intracycle et précision intermédiaire interjournalière sur les appareils BenchMark IHC/ISH.

Plateforme	Répétabilité /Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
ULTRA	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	194/194	100	(98.1, 100)
		Non amplifié	ANA	186/186	100	(98.0, 100)
		Total	OPA	190/190	100	(98.0, 100)
ULTRA	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	139/139	100	(97.3, 100)
		Non amplifié	NPA	135/135	100	(97.2, 100)
		Total	OPA	274/274	100	(98.6, 100)
XT	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplifié	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)

Plateforme	Répétabilité /Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
		Total	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplifié	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Total	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)
GX	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplifié	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Total	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplifié	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Total	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision intermédiaire interappareils pour le carcinome mammaire

La précision intermédiaire interappareils BenchMark IHC/ISH du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée par coloration de deux lames par appareil de 28 échantillons de carcinome mammaire sur trois appareils BenchMark IHC/ISH avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La précision intermédiaire interappareils a été déterminée avec la PPA, la NPA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence (appareils BenchMark XT et BenchMark GX). Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 14.

Tableau 14. Précision intermédiaire interappareils BenchMark IHC/ISH

Plate-forme	Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
ULTRA	Précision intermédiaire interappareils	Amplifié	PPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Non amplifié	NPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Total	OPA	168/168	100	(97.8, 100)
XT	Précision intermédiaire interappareils	Amplifié	PPA	77.3/77.3	100	(95.3, 100)
		Non amplifié	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Total	OPA	168.0/168.0	100	(97.8, 100)
GX		Amplifié	PPA	76.2/76.2	100	(95.2, 100)

Plate-forme	Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
	Précision intermédiaire interappareils	Non amplifié	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Total	OPA	166.9 / 166.9	100	(97.8, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision intra- et interlecteurs pour le carcinome mammaire

Les précisions intralecteur et interlecteurs du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les appareils BenchMark IHC/ISH ont été déterminées par évaluation par trois lecteurs de 60 échantillons de carcinome mammaire colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sur un appareil BenchMark ULTRA. Pour assurer la précision de la lecture, le même ensemble de lames a été lu deux fois après un intervalle minimum de deux semaines entre les lectures. Les précisions intralecteur et interlecteurs ont été déterminées avec l'APA, l'ANA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 15.

Tableau 15.Précisions intralecteur et interlecteurs du test exécuté sur l'appareil BenchMark ULTRA

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Intralecteur	Amplifié	APA	178/181	98.3	(96.3, 100)
	Non amplifié	ANA	174/177	98.3	(96.1, 100)
	Total	OPA	176/179	98.3	(96.1, 100)
Interlecteurs	Amplifié	APA	350/362	96.7	(93.2, 99.4)
	Non amplifié	ANA	342/354	96.6	(92.8, 99.4)
	Total	OPA	346/358	96.6	(92.8, 99.4)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap. Six cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision interplateformes pour le carcinome mammaire

La précision interplateformes d'appareils BenchMark IHC/ISH du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée par évaluation de 28 échantillons de carcinome mammaire colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sur des appareils BenchMark IHC/ISH. La précision interplateformes a été déterminée avec la PPA, la NPA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence. Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 16.

Tableau 16.Précision interplateformes d'appareils BenchMark IHC/ISH

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Précision interplateformes	Amplifié	PPA	230.8/230.8	100	(98.4, 100)

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
	Non amplifié	NPA	271.0/272.2	99.6	(98.3, 100)
	Total	OPA	501.8/502.9	99.8	(99.2, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Appareil BenchMark IHC/ISH : Répétabilité et précision pour l'adénocarcinome gastrique

La répétabilité et la précision du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ont été évaluées sur les appareils BenchMark IHC/ISH en association avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

La répétabilité intracycle a été évaluée en utilisant quatorze échantillons d'adénocarcinome gastrique. Deux lames de chacun des échantillons d'adénocarcinome gastrique ont été colorées avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur un même appareil BenchMark IHC/ISH. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence.

La précision intermédiaire interjournalière a également été évaluée sur des échantillons d'adénocarcinome gastrique. Deux lames par appareil de chacun des 14 échantillons ont été colorées avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur des appareils BenchMark IHC/ISH lors de 5 jours non consécutifs. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence.

La répétabilité intracycle a été déterminée avec la concordance positive moyenne (APA), la concordance négative moyenne (ANA) et le taux de concordance globale (OPA). La précision intermédiaire interjournalière a été déterminée avec le taux de concordance positive (PPA), le taux de concordance négative (NPA) et le taux de concordance globale (OPA) pour toutes les observations de la population évaluable. Une synthèse des résultats des deux études se trouve dans le Tableau 17.

Tableau 17.Appareil BenchMark IHC/ISH : Répétabilité intracycle et précision intermédiaire interjournalière

Plate-forme	Répétabilité/Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
ULTRA	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplifié	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Total	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
ULTRA	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplifié	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Total	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplifié	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Total	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)

Plate-forme	Répétabilité/ Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
XT	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplifié	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Total	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Répétabilité intracycle	Amplifié	APA	64.6/65.1	99.1	(95.9, 100)
		Non amplifié	ANA	70.0/70.6	99.2	(95.2, 100)
		Total	OPA	67.3/67.9	99.2	(96.9, 100)
GX	Précision intermédiaire interjours	Amplifié	PPA	67.3/67.9	99.2	(96.5, 100)
		Non amplifié	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Total	OPA	137.3/137.9	99.6	(98.5, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Deux cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision intermédiaire interappareils pour l'adénocarcinome gastrique

La précision intermédiaire interappareils BenchMark IHC/ISH du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée par coloration de deux lames par appareil de 14 échantillons d'adénocarcinome gastrique sur trois appareils BenchMark IHC/ISH avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La précision intermédiaire interappareils a été déterminée avec la PPA, la NPA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence. Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 18.

Tableau 18. Précision intermédiaire interappareils BenchMark IHC/ISH

Plate-forme	Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
ULTRA	Précision intermédiaire interappareils	Amplifié	PPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Non amplifié	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Total	OPA	84.0/84.0	100	(95.6, 100)
XT	Précision intermédiaire interappareils	Amplifié	PPA	40.4/40.9	98.6	(94.1, 100)
		Non amplifié	NPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Total	OPA	81.3/81.9	99.3	(97.5, 100)
GX		Amplifié	PPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)

Plate-forme	Précision	Statut clinique	Concordance			
			Type	n/N	%	CI à 95 %
	Précision intermédiaire interappareils	Non amplifié	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Total	OPA	82.9/82.9	100	(95.6, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Deux cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précisions intralecteur et interlecteurs pour l'adénocarcinome gastrique

Les précisions intralecteur et interlecteurs du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les appareils BenchMark IHC/ISH ont été déterminées par évaluation par trois lecteurs de 28 échantillons d'adénocarcinome gastrique colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sur un appareil BenchMark ULTRA. Toutes les lames ont été randomisées et masquées quant au diagnostic du cas. Pour assurer la précision intralecteur, le même ensemble de lames a été lu deux fois après un intervalle minimum de deux semaines entre les lectures. Les précisions intralecteur et interlecteurs ont été déterminées avec l'APA, l'ANA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 19.

Tableau 19. Précisions intralecteur et interlecteurs du test exécuté sur l'appareil BenchMark ULTRA

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Interlecteurs	Amplifié	APA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Non amplifié	ANA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Total	OPA	80/84	95.2	(90.5, 100)
Intralecteur	Amplifié	APA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Non amplifié	ANA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Total	OPA	82/84	97.6	(95.2, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap. Deux cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision interplateformes pour l'adénocarcinome gastrique

La précision interplateformes d'appareils BenchMark IHC/ISH du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée par évaluation de 14 échantillons d'adénocarcinome gastrique colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail à l'aide du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sur des appareils BenchMark IHC/ISH. La précision interplateformes a été déterminée avec la PPA, la NPA et l'OPA pour toutes les observations de la population évaluable. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence. Une synthèse des résultats de cette étude se trouve dans le Tableau 20.

Tableau 20. Appareil BenchMark IHC/ISH : Précision interplateformes

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
	Amplifié	PPA	123.3/123.9	99.5	(98.1, 100)

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Précision interplateformes	Non amplifié	NPA	124.9/124.9	100	(97.0, 100)
	Total	OPA	248.2/248.8	99.8	(99.2, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Deux cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Précision interlots pour le carcinome mammaire

La précision interlots a été déterminée en testant trois lots de production du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, du VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et du VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sur les appareils BenchMark ULTRA. Vingt-huit cas de carcinome du sein ont été colorés avec chaque sonde et chaque kit de détection. Une synthèse des résultats de la précision interlots du test se trouve dans le Tableau 21.

Tableau 21. Précision interlots

Précision	Statut clinique	Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Interlots	Amplifié	PPA	121/121	100	(96.9, 100)
	Non amplifié	NPA	123/123	100	(97.0, 100)
	Total	OPA	244/244	100	(98.5, 100)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Étude de reproductibilité interlaboratoires sur l'appareil BenchMark ULTRA pour le carcinome mammaire et l'adénocarcinome gastrique

Une étude de reproductibilité interlaboratoires (RIL) a été réalisée pour évaluer la reproductibilité du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail pour la détermination du statut du gène *HER2* sur des tissus de carcinome mammaire et d'adénocarcinome gastrique colorés sur l'appareil BenchMark ULTRA en association avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Vingt-huit échantillons de tissus FFPE d'adénocarcinome mammaire et gastrique ont été utilisés et environ la moitié de ces cas étaient amplifiés pour l'état d'expression *HER2* et l'autre moitié était non amplifiée pour l'état *HER2*.

Plusieurs coupes de tissus ont été prélevées sur chaque échantillon et fournies à trois sites d'examen externes. Chaque centre a procédé à la coloration de 28 cas de carcinome mammaire et 28 cas d'adénocarcinome gastrique lors de 5 jours non consécutifs sur une période minimale de 20 jours. Suite à la coloration sur un appareil BenchMark ULTRA, un lecteur a évalué chaque lame pour déterminer le statut du gène *HER2*.

Les résultats de l'étude sont résumés dans le Tableau 22 et le Tableau 23. Les données ont été analysées pour déterminer le PPA et le NPA pour toutes les observations. Pour chaque cas, toutes les observations évaluables (amplifié vs non amplifié) ont été comparées au résultat modal de chaque cas. Les cas avec un rapport compris entre 1.5 et 2.5 ont été pondérés par leur fréquence. Les comparaisons de tous les centres et de tous les jours ont été regroupées, puis les résultats de tous les cas ont été agrégés.

Tableau 22. RIL : Taux de concordance sur l'appareil BenchMark ULTRA pour le carcinome mammaire.

Reproductibilité interlaboratoires		Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Intercentres (3 centres)		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)
Interjours (5 jours non consécutifs)	Centre 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)
	Centre 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)
	Centre 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)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Tableau 23. RIL : Taux de concordance sur l'appareil BenchMark ULTRA pour l'adénocarcinome gastrique.

Reproductibilité interlaboratoires		Concordance			
		Type	n/N	%	CI à 95 %
Intercentres (3 centres)		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)
Interjours (5 jours non consécutifs)	Centre 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)
	Centre 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)
	Centre 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)

Remarque : Les CI à 95 % ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap ; dans les cas où l'estimation ponctuelle était de 100 %, la méthode du score de Wilson a été utilisée. Quatre cas avec des rapports à l'ISH s'étalant de 1.5 à 2.5 ont été inclus à l'étude.

Performances du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS

Concordance entre l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA pour le carcinome du sein

Trois laboratoires, de trois établissements différents situés aux États-Unis, ont participé à une étude de concordance entre l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA. L'étude a porté sur 193 cas de carcinome invasif du sein FFPE différents qui représentaient la plage de coloration du test VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, avec une répartition quasiment égale entre cas *HER2* amplifié et cas *HER2* non amplifié. Les lames de tissus de tous les cas ont été colorées au H&E ainsi qu'au VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail de Roche sur un appareil BenchMark ULTRA en utilisant le protocole de coloration recommandé. Les lames de tissu non colorées de tous les cas ont été randomisées et réparties de manière égale (64-65 cas/par site) entre les centres de l'étude pour être colorées sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS en utilisant le protocole de coloration VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail recommandé. Des anatomopathologistes, mis en aveugle quant au statut du cas, ont évalué les lames colorées sur un appareil BenchMark IHC/ISH et ont déterminé l'état du gène *HER2*. Après deux semaines, les anatomopathologistes ont évalué les lames colorées sur le deuxième appareil BenchMark IHC/ISH. Le statut du gène *HER2* a été déterminé à partir du rapport entre les signaux pour le gène *HER2* et les signaux pour le chromosome 17 (Chr17) (le rapport *HER2*/Chr17) dans le noyau des cellules tumorales. Si le rapport était égal ou supérieur à 2.0, le cas était considéré comme *HER2* amplifié ; s'il était inférieur à 2.0, il était considéré comme *HER2* non amplifié. Les résultats ont été analysés par Roche. L'OPA, le PPA et le NPA étaient de, respectivement, 97.1 % (535/551), 97.3 % (248/255) et 97.0 % (287/296). Les résultats sont résumés dans le Tableau 24.

Tableau 24. Taux de concordance groupés entre les statuts du gène *HER2* déterminés pour des cas de carcinomes du sein colorés avec le VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA

Statut du gène <i>HER2</i> avec le BenchMark ULTRA PLUS	Statut du gène <i>HER2</i> avec le BenchMark ULTRA		Total
	Amplifié	Non amplifié	
Amplifié	248	9	257
Non amplifié	7	287	294
Total	255	296	551
	n/N	% (CI à 95 %)	
PPA	248/255	97.3 (95.0, 99.2)	
NPA	287/296	97.0 (94.8, 99.0)	
OPA	535/551	97.1 (95.5, 98.6)	

Remarque : Les CI bilatéraux à 95 % ont été calculés à l'aide de la méthode du percentile bootstrap à partir de 2000 répliqués avec stratification en fonction des quatre catégories de score diagnostique utilisées lors de la sélection des cas (amplifié [non à la limite], non amplifié [non à la limite], à la limite de l'amplification, à la limite de la non-amplification)

Étude de reproductibilité interlaboratoires sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS pour le carcinome du sein

Une étude de reproductibilité interlaboratoires (RIL) a été réalisée pour évaluer la reproductibilité du VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail pour la détermination du statut du gène *HER2* sur des tissus de carcinome mammaire colorés sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS en association avec le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Vingt-huit cas de carcinome invasif du sein FFPE différents qui représentaient la plage de coloration du test VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail ont été utilisés avec une répartition quasiment égale entre cas *HER2* amplifié et cas *HER2* non amplifié.

Plusieurs coupes de tissus ont été prélevées sur chaque échantillon et fournies à trois sites d'examen externes. Les 28 cas ont été colorés sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS lors de 5 jours non consécutifs sur une période minimale de 20 jours dans chaque centre. Les lecteurs ont évalué les lames et déterminé leur statut du gène *HER2*.

Les résultats sont résumés dans le Tableau 25 et le Tableau 26. Les données ont été analysées pour déterminer la PPA, la NPA et l'OPA dans le Tableau 25 et l'APA, l'ANA et l'OPA dans le Tableau 26 pour toutes les observations. Pour chaque cas, toutes les observations évaluable (amplifié vs non amplifié) ont été comparées au résultat modal de chaque cas. Les comparaisons de tous les centres et de tous les jours ont été regroupées, puis les résultats de tous les cas ont été agrégés.

Tableau 25. RIL : Taux de concordance avec le statut modal sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS pour le carcinome mammaire.

Reproductibilité interlaboratoires	Concordance			
	Type	n/N	%	CI à 95 %
Globalement	PPA	372/381	97.6	(95.3, 100.0)
	NPA	421/440	95.7	(91.1, 99.3)
	OPA	793/821	96.6	(94.3, 98.5)
Intercentres (3 centres)	PPA	380/389	97.7	(95.3, 100.0)
	NPA	421/432	97.5	(95.3, 99.3)
	OPA	801/821	97.6	(96.3, 98.7)
Interlecteurs	PPA	383/389	98.5	(97.1, 99.5)
	NPA	424/432	98.1	(97.1, 99.0)
	OPA	807/821	98.3	(97.5, 99.0)

Remarque : Les CI à 95 % bilatéraux ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap.

Tableau 26. RIL : Taux de concordance par paire sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS pour le carcinome mammaire

Reproductibilité interlaboratoires	Concordance			
	Type	n/N	%	CI à 95 %
Intercentres (3 centres)	APA	7204/7652	94.1	(91.1, 96.9)
	ANA	7968/8416	94.7	(91.5, 97.4)
	OPA	7586/8034	94.4	(91.5, 97.1)
Interlecteurs	APA	370/390	94.9	(92.5, 97.1)
	ANA	408/428	95.3	(92.7, 97.5)
	OPA	389/409	95.1	(92.7, 97.3)
Interjours (5 jours non consécutifs)	APA	1472/1519	96.9	(95.5, 98.2)
	ANA	1642/1689	97.2	(95.8, 98.5)
	OPA	1557/1604	97.1	(95.7, 98.3)

Remarque : Les CI à 95 % bilatéraux ont été calculés par la méthode du percentile bootstrap.

Concordance entre l'appareil BenchMark ULTRA PLUS et l'appareil BenchMark ULTRA pour le carcinome gastrique

L'étude a porté sur 109 cas de carcinome gastrique invasif FFPE différents qui représentaient la plage de coloration du test VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, avec une répartition quasiment égale entre cas *HER2* amplifié et cas *HER2* non amplifié. Les lames de tissus ont été colorées sur un appareil BenchMark ULTRA PLUS et un appareil BenchMark ULTRA en utilisant le protocole de coloration recommandé. Les lames colorées ont été évaluées par un anatomopathologiste. Le taux de concordance globale

pour la coloration avec le VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail déduit du statut du gène *HER2* (*HER2* amplifié, *HER2* non amplifié) était de 92.4 %. Les intervalles de confiance bilatéraux à 95 %, de 84.4 % à 96.5 %, ont été calculés à l'aide de la méthode du score de Wilson. Les taux d'acceptabilité du bruit de fond et de la morphologie de tous les cas étaient de 100 % pour l'appareil BenchMark ULTRA PLUS.

Études de précision sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS pour le cancer gastrique

Douze cas de tissu de cancer gastrique, qui représentaient la plage de coloration du test VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, ont été colorés sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS. Les cas étaient répartis de façon quasiment égale entre statut du gène *HER2* amplifié et statut du gène *HER2* non amplifié. Les lames colorées ont été évaluées par un anatomopathologiste. Tous les taux de concordance ont été calculés avec des intervalles de confiance à 95 % bilatéraux calculés par la méthode du percentile bootstrap.

Pour la répétabilité intracycle, cinq lames par cas ont été colorées sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS. Le taux de concordance globale pour la coloration avec le VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail déduit du statut du gène *HER2* (*HER2* amplifié, *HER2* non amplifié) était de 91.7 % (CI à 95 % : 81.7, 100.0).

Pour la précision intermédiaire interjournalière, deux lames par cas ont été colorées sur l'appareil BenchMark ULTRA PLUS au cours de cinq cycles de coloration réalisés sur une période de cinq jours non consécutifs. Le taux de concordance globale pour la coloration avec le VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail déduit du statut du gène *HER2* (*HER2* amplifié, *HER2* non amplifié) était de 90.8 % (CI à 95 % : 80.8, 100.0).

Pour la précision intermédiaire interappareils, deux lames par cas ont été colorées sur chacun des trois appareils BenchMark ULTRA PLUS. Le taux de concordance globale pour la coloration avec le VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail déduit du statut du gène *HER2* (*HER2* amplifié, *HER2* non amplifié) était de 92.6 % (CI à 95 % : 84.5, 100.0).

Sensibilité et spécificité

La spécificité analytique (efficacité de l'hybridation) du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a été déterminée par coloration d'étalements métaphasiques de cellules humaines normales sur un appareil BenchMark ULTRA. Sur 100 étalements métaphasiques analysés, 100 % présentaient une colocalisation spécifique des sondes *HER2* et du chromosome 17.

La sensibilité analytique mesure la capacité de la sonde à détecter sa cible spécifique, tandis que la spécificité est sa capacité à faire la distinction entre la cible et les autres séquences dans l'échantillon. Le test possède un contrôle de sensibilité et de spécificité analytique intégré à chaque tissu humain. Les cellules humaines normales (dont les fibroblastes du stroma, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les cellules épithéliales mammaires non néoplasiques) devraient contenir une ou deux copies du gène *HER2* et du Chr17. La détection d'une à deux copies de *HER2* et du Chr17 dans des cellules humaines normales indique donc que les sondes détectent leur cible spécifique (une mesure de la sensibilité). La détection de seulement une à deux copies du gène *HER2* et du Chr17 dans des cellules humaines normales indique également que les sondes détectent uniquement leur cible spécifique (une mesure de la spécificité). Le taux de résultats concluants au premier essai pour le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les 40 échantillons mammaires fixés conformément aux recommandations ASCO CAP (NBF à 10 % pendant 6 à 72 heures) était de 97.5 % (87.1-99.6) sur les appareils BenchMark ULTRA, 100 % (91.2-100) sur les appareils BenchMark XT et 97.5 % (87.1-99.6) sur les appareils BenchMark GX. La spécificité sur les mêmes 40 échantillons de sein sans contrôle de sonde était de 100 % (91.2-100) sur les appareils BenchMark ULTRA.

Le taux de résultats concluants au premier essai pour le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sur les 39 échantillons gastriques fixés conformément aux recommandations ASCO CAP (NBF à 10 % pendant 6 à 72 heures) était de 97.4 % (86.8-99.5) sur les appareils BenchMark ULTRA, 97.4 % (86.8-99.5) sur les appareils BenchMark XT et 100 % (91-100) sur les appareils BenchMark GX.

La sensibilité et la spécificité analytiques ont également été évaluées en colorant plusieurs cas de tissus humains normaux et néoplasiques avec le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, le VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit et le VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Les résultats se trouvent dans le Tableau 27 et le Tableau 28. Aucune coloration inattendue avec le test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail n'a été observée sur les tissus normaux et néoplasiques.

Tableau 27. Sensibilité et spécificité du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail déterminées par coloration de tissus normaux FFPE.

Tissu	Nbre de cas acceptables/nbre total	Tissu	Nbre de cas acceptables/nbre total
Glande surrénale	3/3	Poumon	3/3
Vessie	3/3	Ganglion lymphatique	3/3
Moelle osseuse	3/3	Mésothélium	3/3
Ovaire	3/3	Pancréas	3/3
Sein	3/3	Parathyroïde	3/3
Cervelet	3/3	Nerf périphérique	3/3
Cerveau	3/3	Prostate	3/3
Col de l'utérus	3/3	Muscle squelettique	3/3
Côlon	3/3	Peau	3/3
Endomètre	3/3	Rate	3/3
Œsophage	3/3	Estomac	3/3
Cœur	3/3	Testicule	3/3
Hypophyse (glande pituitaire)	3/3	Thymus	3/3
Intestin	3/3	Thyroïde	3/3
Rein	3/3	Langue/Glande salivaire	3/3
Foie	3/3	Amygdale	3/3

Tableau 28. Sensibilité et spécificité du test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail déterminées par coloration de divers tissus néoplasiques FFPE.

Pathologie	Nbre de cas acceptables/nbre total
Glioblastome (cerveau)	3/3
Méningiome (cerveau)	1/1
Oligodendrogliome (cerveau)	1/1
Carcinome endométrioïde (ovaire)	1/1
Adénocarcinome (ovaire)	1/1
Néoplasme neuroendocrine pancréatique (pancréas)	1/1
Adénocarcinome (pancréas)	1/1
Séminome (testicule)	1/1
Carcinome embryonnaire (testicule)	1/1
Carcinome médullaire (thyroïde)	1/1
Carcinome papillaire (thyroïde)	1/1
Carcinome canalaire in situ (sein)	1/1
Carcinome canalaire invasif (sein)	2/2
Lymphome B, SAI (rate)	1/1
Carcinome à petites cellules (poumon)	1/1

Pathologie	Nbre de cas acceptables/ nbre total
Carcinome épidermoïde (poumon)	1/1
Adénocarcinome (œsophage)	1/1
Carcinome épidermoïde (œsophage)	1/1
Adénocarcinome (estomac)	1/1
Adénocarcinome (jonction gastro-œsophagienne)	1/1
Adénocarcinome (intestin grêle)	1/1
Tumeur stromale gastro-intestinale (GIST) (intestin grêle)	1/1
Tumeur stromale gastro-intestinale (GIST) (côlon)	1/1
Adénocarcinome (côlon)	1/1
Adénocarcinome (rectum)	1/1
Tumeur stromale gastro-intestinale (GIST) (rectum)	1/1
Hépatoblastome (foie)	1/1
Carcinome hépatocellulaire (foie)	1/1
Carcinome à cellules claires (rein)	1/1
Adénocarcinome (prostate)	2/2
Léiomyome (utérus)	1/1
Adénocarcinome endométriote (utérus)	1/1
Carcinome à cellules claires (utérus)	1/1
Carcinome épidermoïde (col de l'utérus)	2/2
Rhabdomyosarcome embryonnaire (muscle strié)	1/1
Carcinome épidermoïde (peau)	1/1
Carcinome basocellulaire (peau)	1/1
Neurofibrome (lombaire)	1/1
Neuroblastome (rétro-péritoine)	1/1
Mésothéliome (péritoine)	1/1
Lymphome B, SAI (ganglion lymphatique)	2/2
Lymphome de Hodgkin (ganglion lymphatique)	3/3
Lymphome anaplasique à grandes cellules (ganglion lymphatique)	1/1
Léiomyosarcome (vessie)	1/1
Carcinome urothélial (vessie)	1/1
Ostéosarcome (os)	1/1
Mésothéliome (péritoine)	1/1
Léiomyosarcome (muscle lisse)	1/1

RESOLUTION DES PROBLEMES

Tableau 29. Résolution des problèmes.

Problème	Solution
Coloration par SISH faible ou absent	- Vérifier si les distributeurs de réactif fonctionnent correctement (s'ils ne sont pas obstrués ou vides) et si les bidons de solutions génériques sont remplis. Vérifier qu'il n'y a pas de corps ou de particules étrangers, tels que des fibres ou des précipités, dans la chambre d'amorçage ou le ménisque des distributeurs de réactifs. Si le distributeur est bloqué, cesser de l'utiliser et contacter un représentant du service client local. Sinon, réamorcer le distributeur en retirant le capuchon de l'embout et en appuyant sur la partie supérieure du distributeur en le pointant au-dessus d'un récipient à déchets. Si la coloration est toujours faible ou absente, essayer la solution 2 ci-dessous. - S'assurer que le type et la durée de fixation et l'épaisseur des coupes sont appropriés pour les tests par ISH. - S'assurer d'utiliser un milieu de montage compatible avec la SISH (voir le Tableau 30) pour préserver les signaux de SISH. Si la coloration est toujours faible ou absente, essayer la solution 4 ci-dessous. - Augmenter la durée de l'étape CC1 à > 16 min. - Augmenter la durée de l'étape CC2 à > 16 min pour le carcinome gastrique ou à > 24 min pour le carcinome mammaire. - Augmenter le temps d'incubation avec l'ISH Protease 3 à > 16 min pour le carcinome gastrique ou à > 20 min pour le carcinome mammaire si la morphologie nucléaire est intacte.
Coloration par Red ISH faible ou absente	- Vérifier si les distributeurs de réactif fonctionnent correctement (s'ils ne sont pas obstrués ou vides) et si les bidons de solutions génériques sont remplis. Si la coloration est toujours faible ou absente, essayer la solution 2 ci-dessous. - Veiller à ne pas utiliser de bains d'alcool ni de rinçages prolongés au xylène pour déshydrater les lames colorées, car cela dégrade les signaux de Red ISH. Si la coloration est toujours faible ou absente, essayer la solution 3 ci-dessous. - S'assurer que le type et la durée de fixation et l'épaisseur des coupes sont appropriés pour les tests par ISH. - Augmenter la durée de l'étape CC1 à > 16 min. - Augmenter le temps d'incubation avec la CC2 à > 16 min pour le carcinome gastrique ou à > 24 min pour le carcinome mammaire. - Augmenter le temps d'incubation avec l'ISH Protease 3 à > 16 min pour le carcinome gastrique ou à > 20 min pour le carcinome mammaire si la morphologie nucléaire est intacte.
Bruit de fond de Red ISH non spécifique	- Veillez à utiliser des lames chargées positivement et à fixer et couper les échantillons de façon appropriée pour les tests par ISH. - Si le bruit de fond de Red ISH est discernable des signaux de Red ISH spécifiques, compter les signaux de Red ISH spécifiques de la lame en évitant de compter les signaux non spécifiques. - Si le bruit de fond de Red ISH dans le noyau gêne la numération, refaire la coloration en augmentant la température de lavage stringente à 76 ou 78 °C. La réduction du temps de démasquage cellulaire ou de traitement à la protéase permet aussi de réduire le bruit de fond rouge.

Problème	Solution
Bruit de fond de SISH non spécifique	1. Veillez à utiliser des lames chargées positivement et à fixer et couper les échantillons de façon appropriée pour les tests par ISH. 2. Si le bruit de fond de SISH est discernable des signaux de SISH spécifiques, compter les signaux de SISH spécifiques de la lame en évitant de compter les signaux non spécifiques. 3. Si le bruit de fond de SISH gêne la numération, refaire la coloration en réduisant le temps de démasquage cellulaire ou de traitement à la protéase.
Précipitation	1. Si des artefacts de précipitation gêne la numération, refaire la coloration. Si le bruit de fond de SISH est discernable des signaux de SISH spécifiques, compter les signaux de SISH spécifiques de la lame en évitant de compter les signaux non spécifiques. 2. S'assurer que les étiquettes code-barres des lames sont bien centrées sans dépassement. Ne pas doubler les étiquettes code-barres ou les réapposer.
Présence de bulles	1. Si des bulles gênent la numération, s'assurer que les procédures pré-analytiques et l'épaisseur des échantillons sont conformes aux recommandations.
Les tissus se détachent des lames.	1. Veiller à utiliser des lames positivement chargées.

Tableau 30. Compatibilité des milieux de montage avec les tests de SISH.

Milieu de montage	Fabricant	Type (xylène, alcool, aqueux)	Compatibilité avec la SISH
Entellan	Merck	Xylène	Non
Entellan New	Merck	Xylène	Non
Eukitt	EMS	Xylène	Non
HSR	Sysmex	Xylène	Non
Malinol	Muto Chemical	Xylène	Non
Acrytol	SurgiPath	Xylène	Oui
Alcolmount	Diapath	Alcool	Oui
BioMount 2	BBInternational	Xylène	Oui
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xylène	Oui
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Xylène	Oui
Diamount	Diapath	Xylène	Oui
DPX	BDH : Raymond Lamb	Xylène	Oui
FloTexx	Lerner Labs	Xylène	Oui
Gel Mount	Biomeda	Aqueux	Oui
Histomount	Raymond Lamb	Xylène	Oui
MicroMount	SurgiPath	Xylène	Oui
MM24	SurgiPath	Xylène	Oui
Mountex	Histolab	Xylène	Oui
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Aqueux	Oui

Milieu de montage	Fabricant	Type (xylène, alcool, aqueux)	Compatibilité avec la SISH
Paramount	Protaqs Quartett : Dako	Xylène	Oui
Permunt	Fisher	Xylène	Oui
Pertex	Cell Path	Xylène	Oui
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xylène	Oui
Softmount	WAKO	Lemasol A	Oui
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xylène	Oui
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xylène	Oui
Ultramount	Dako	Xylène	Oui

REFERENCES

1. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
2. Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egfr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
3. Hudis CA. Trastuzumab--Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
4. Comejo KM, Kandil D, Khan A, et al. Theranostic and Molecular Classification of Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):44-56.
5. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2019.
6. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, et al. Her2/Neu Role in Breast Cancer: From a Prognostic Foe to a Predictive Friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007;19(1):56-62.
7. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
15. 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.

16. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to Her2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc.* 2019;90(1):44-54.
17. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5):v38-v49
18. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. Her2 Screening Data from Toga: Targeting Her2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *Gastric Cancer.* 2015;18(3):476-484.
19. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. Her2 Testing in Gastric Cancer: An Update. *World J Gastroenterol.* 2016;22(19):4619-4625.
20. Carson FL, Cappellano C. *Histotechnology; A Self-Instructional Text*, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
21. 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.
22. 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.
23. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
24. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
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.

COORDONNEES



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

www.roche.com



REMARQUE : Un point est toujours utilisé dans ce document comme séparateur décimal et indique la séparation entre la partie entière et la partie décimale d'un nombre. Aucun séparateur de milliers n'est utilisé.

Le résumé des résultats sur la sécurité et les performances est disponible ici :

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

Symboles

Ventana utilise les symboles et les signes suivants en plus de ceux indiqués dans la norme ISO 15223-1 (pour les USA, voir elabdoc.roche.com/symbols pour de plus amples informations).



Code article international

Rx only

Pour les USA : Attention : La loi fédérale stipule que ce produit peut uniquement être vendu par un médecin ou sur prescription médicale.

HISTORIQUE DES REVISIONS

Rév.	Mises à jour
C	Mises à jour des sections Avertissements et précautions d'emploi et Références. Mises à jour avec les modèles actuels.

PROPRIETE INTELLECTUELLE

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, PATHWAY et ULTRAVIEW sont des marques commerciales de Roche. Tous les autres noms de produit et marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

5. Numération des signaux de la zone cible 1 : Compter les signaux pour HER2 et les signaux pour le Chr17 dans 20 noyaux séparément. Faire la somme des signaux comptés pour HER2. Faire la somme des signaux comptés pour le Chr 17. Calculer le rapport pour le statut du gène en divisant le TOTAL des signaux pour HER2 par le TOTAL des signaux pour le Chr 17. Arrondir au premier chiffre après la virgule. Préciser si des amas de signaux ont été comptés.

6. Résultat de 20 noyaux : 6a. ☐ Non amplifié : HER2/Chr17 < 2.0 ou 6b. ☐ Amplifié : HER2/Chr17 ≥ 2.0
Si le rapport HER2/Chr17 est compris entre 1.8 et 2.2, les signaux de 20 noyaux supplémentaires doivent être comptés.

7. Numération des signaux de la zone cible 2 : Compter les signaux pour HER2 et les signaux pour le Chr17 dans 20 noyaux séparément. Faire la somme des signaux comptés pour HER2. Faire la somme des signaux comptés pour le Chr 17. Préciser si des amas de signaux ont été comptés.

8. Résultat du total des 40 noyaux :

8a. Total HER2 de la zone cible 1 _____ + Total HER2 de la zone cible 2 _____ = Total des signaux HER2 _____
(de la case 5u) (de la case 7u)

8b. Total Chr17 de la zone cible 1 _____ + Total Chr17 de la zone cible 2 _____ = Total des signaux Chr17 _____
(de la case 5u) (de la case 7u)

8c. **Rapport :** Total HER2 / Total Chr17

8d. **Résultat final de 40 noyaux :** ☐ Non amplifié : HER2/Chr17 < 2.0 ou ☐ Amplifié : HER2/Chr ≥ 2.0