

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043

08314373001

IVD 30

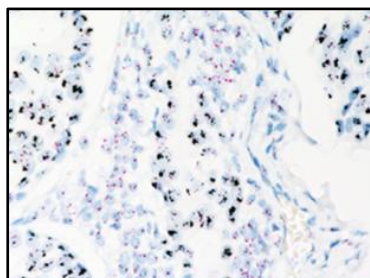


Figura 1. Stato HER2 amplificato con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, carcinoma mammario.

USO PREVISTO

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è indicato per la determinazione dello stato del gene *HER2* tramite enumerazione del rapporto tra il gene *HER2* e Chromosome 17 mediante microscopio ottico. Le sonde *HER2* e Chromosome 17 vengono rilevate utilizzando l'ibridazione in situ (ISH) cromogenica a due colori in campioni di tessuto di carcinoma mammario e gastrico fissati in formalina e inclusi in paraffina, inclusa la giunzione gastroesofagea, a seguito di colorazione su strumenti

BenchMark IHC/ISH.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail indicato come supporto nella valutazione di pazienti per i quali viene preso in considerazione la terapia con Herceptin (trastuzumab). I risultati ottenuti tramite questo prodotto devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati.

Questo prodotto è indicato per uso diagnostico in vitro (IVD).

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

Il recettore del fattore di crescita dell'epidermide 2 (*HER2*) umano appartiene a una sottofamiglia di fattori di crescita dell'epidermide costituiti da recettori tirosin-chinasi transmembrana che mediano la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule.^{1,2} Il 15–30% circa dei casi di carcinoma mammario presenta sovraespressione della proteina *HER2*, amplificazione del gene *HER2* (*ERBB2*) o entrambe.^{3,4} La conoscenza dello stato del gene *HER2* e/o della proteina nei pazienti affetti da carcinoma mammario invasivo consente ai medici di prendere decisioni più oculate per migliorare la gestione complessiva della cura di tali pazienti.⁵ Lo stato *HER2* è un fattore predittivo consolidato per la risposta alla terapia mirata a *HER2* nei pazienti affetti da carcinoma mammario.^{5,6,7}

Trastuzumab (Herceptin) è un anticorpo monoclonale umanizzato contro il dominio extracellulare di *HER2* e ha mostrato che i pazienti con carcinoma mammario *HER2* positivo possono trarne beneficio.⁸⁻¹³ La dimostrazione dell'amplificazione del gene *HER2* e/o la sovraespressione della proteina è essenziale per selezionare i pazienti idonei alla terapia con trastuzumab.^{5,14}

Allo stesso modo, l'amplificazione del gene *HER2* o la sovraespressione della proteina si osservano nell'adenocarcinoma gastrico e della giunzione gastroesofagea (collettivamente conosciuto come adenocarcinoma gastroesofageo o GEA).^{15,16,17} Negli studi pubblicati è stata riportata un'ampia gamma di frequenze di sovraespressione di *HER2*. Tuttavia, una delle più grandi serie di dati di screening che ha incluso 3803 pazienti affetti da GEA ha riportato che il 22% dei pazienti risultava positivo per l'espressione della proteina *HER2* o per l'amplificazione del relativo gene.¹⁸ La maggior parte degli studi suggerisce che in assenza di terapia diretta contro *HER2*, la sovraespressione di *HER2* è un fattore prognostico negativo.¹⁹

La terapia mirata a *HER2* con trastuzumab è un caposaldo nella gestione del carcinoma mammario invasivo e ha un valore terapeutico nella gestione dei pazienti con carcinoma gastrico/GEA che sovraesprimono il recettore.^{15,17} La dimostrazione dell'amplificazione del gene *HER2* e/o della sovraespressione della proteina è essenziale per selezionare i pazienti idonei alla terapia con trastuzumab.^{15,19} Studi clinici hanno dimostrato che i pazienti con carcinoma mammario o gastrico/GEA con elevata sovraespressione della proteina *HER2* e/o amplificazione del gene traggono beneficio da trastuzumab.^{3,15}

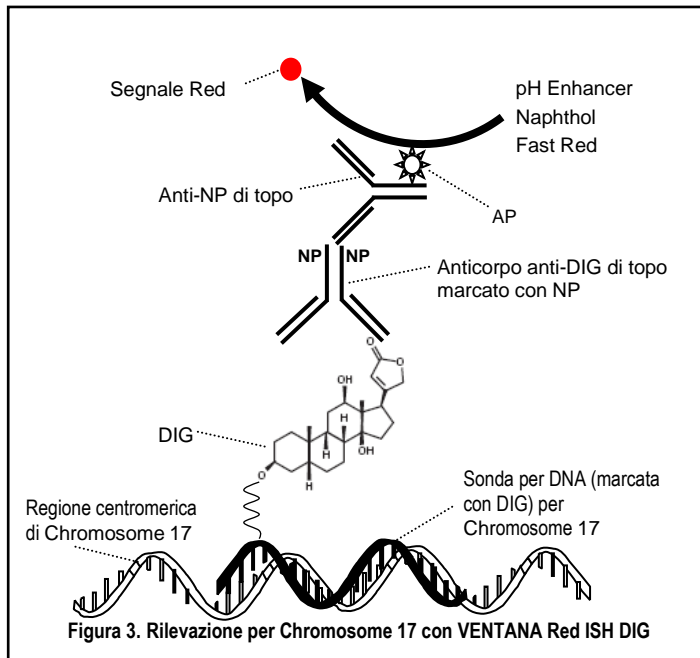
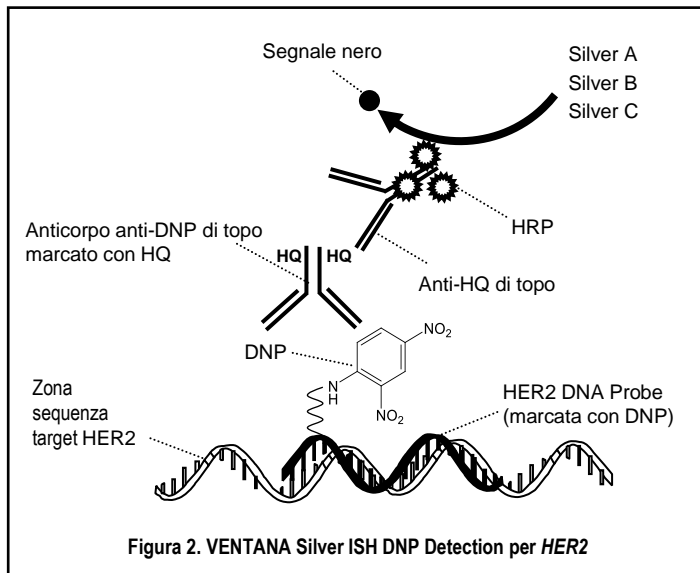
PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contiene sonde per *HER2* (marcate con l'aptene dinitrofenolo o DNP) e sonde per Chromosome 17 (marcate con l'aptene digossigenina o DIG) con formulazione in un tampono a base di formammide. Le sonde sono progettate per rilevare l'amplificazione del gene *HER2* nel carcinoma mammario invasivo e GEA. La sonda *HER2* DNA Probe è una miscela di sonde oligo che hanno come target specifico il gene *HER2* (noto anche come *ERBB2* e *NEU*), che si trova su Chromosome 17 (17q12) umano. La sonda per il cromosoma 17 è una miscela di sonde oligo che hanno come target sequenze nella regione centromerica e funge da riferimento per l'aneusomia. I numeri di copie di entrambe le sonde vengono enumerati nei nuclei tumorali e i risultati sono riportati come rapporto *HER2*/Chromosome 17 per determinare lo stato di amplificazione del gene *HER2* (un rapporto *HER2*/Chromosome 17 ≥ 2.0 indica amplificazione, mentre un rapporto < 2.0 indica non amplificazione). VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è formulato in modo ottimale per l'uso con VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit e reagenti ausiliari su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

Il kit di rilevazione contiene un anticorpo primario e un anticorpo secondario marcato con enzima coniugato con perossidasi di rafano (HRP) o fosfatasi alcalina (AP) utilizzato come enzima cromogenico. Durante il processo di colorazione a doppia ibridazione in situ (ibridazione Dual in situ o Dual ISH), le sonde marcate con DNP e DIG sono co-ibridizzate alle rispettive sequenze di DNA target specifiche all'interno dei nuclei cellulari. La rilevazione della sonda per *HER2* marcata con DNP avviene per prima impiegando VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit, che contiene i seguenti erogatori: anticorpo primario anti-DNP di topo marcato con idrossichinossalina (HQ), anticorpo secondario anti-HQ di topo coniugato con perossidasi di rafano (HRP), Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) e Chromogen C (Silver C). A seguito dell'incubazione con l'anticorpo primario anti-DTP di topo marcato con HQ e successivamente con l'anticorpo secondario anti-HQ di topo coniugato con HRP, avviene la reazione SISH. In breve, questa reazione è spinta dall'aggiunta in sequenza di Chromogens A (acetato di argento), B (idrochinone) e C (H_2O_2). Qui, l'idrochinone riduce gli ioni di argento (Ag^+) in atomi di argento metallico (Ag^0). Questa reazione è alimentata dal substrato per HRP, il perossido di idrogeno (Chromogen C). Il precipitato di argento si deposita nei nuclei e una singola copia del gene *HER2* è visibile come un punto nero. La reazione SISH è illustrata in Figura 2.

Dopo la rilevazione SISH di *HER2*, la sonda per Chromosome 17 marcata con DIG viene rilevata con VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Questo kit include i seguenti erogatori: anticorpo primario anti-DIG di topo marcato con nitropirazolo (NP), anticorpo secondario anti-NP di topo coniugato con fosfatasi alcalina (AP), pH Enhancer, Naphthol e Fast Red. A seguito dello sviluppo del segnale SISH, il vetrino viene incubato con l'anticorpo primario anti-DIG di topo marcato con NP che si lega all'aptene DIG sulla sonda Chromosome 17. L'anticorpo primario anti-aptene viene rilevato con l'anti-NP di topo coniugato con l'enzima AP. Il vetrino viene incubato con la soluzione pH Enhancer, che fornisce le concentrazioni e i componenti salini adeguati e il pH tamponato per garantire prestazioni ottimali dell'enzima AP. Nella fase successiva si applica fosfato di naftolo, che funge da substrato per l'enzima AP (l'AP esegue la defosforilazione del naftolo). Il Fast Red, aggiunto di seguito al vetrino, si combina con il naftolo defosforilato per formare un precipitato rosso, facilmente visualizzabile mediante un microscopio ottico. La reazione Red ISH è illustrata in Figura 3. Il campione viene quindi sottoposto a controcolorazione con Hematoxylin II per l'interpretazione al microscopio ottico.

Il protocollo di colorazione è articolato in varie fasi nelle quali i reagenti vengono incubati per periodi di tempo pre-determinati a temperature specifiche. Al termine di ogni fase di incubazione, lo strumento BenchMark IHC/ISH lava le sezioni per rimuovere il materiale non legato e applica una soluzione coverslip che minimizza l'evaporazione dei reagenti acquosi dal vetrino. L'interpretazione dei risultati avviene al microscopio ottico impiegando obiettivi da 20x, 40x e/o 60x.



MATERIALI FORNITI

L'erogatore VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contiene una quantità di reagente sufficiente per 30 test.
 Un erogatore da 6 mL di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail contiene circa 14 µg/mL di sonde per HER2 marcate con dinitrofenolo (DNP) e 0.24 µg/mL di sonde per Chromosome 17 marcate con digossigenina (DIG) con formulazione in un tampone di ibridazione a base di formammide. Entrambe le sonde sono usate per determinare lo stato del gene HER2 (ossia il rapporto di HER2/Chromosome 17).
 Fare riferimento alle schede metodologiche del kit di rilevazione VENTANA appropriato per le descrizioni dettagliate di quanto segue: Principio della procedura, Materiali e metodi, Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi, Procedure di controllo qualità, Risoluzione dei problemi, Interpretazione dei risultati e Limitazioni.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- I reagenti di colorazione, quali i kit di rilevazione VENTANA e i componenti ausiliari, non sono forniti.
 È possibile che non tutti i prodotti elencati nella scheda metodologica siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.
 I reagenti e materiali seguenti sono necessari per la colorazione ma non sono forniti:
1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (n. di cat. 760-516 / 08318883001)
 2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (n. di cat. 760-512 / 08318832001)
 3. HybReady Solution (n. di cat. 780-4409 / 05917557001)
 4. ISH Protease 3 (n. di cat. 780-4149 / 05273331001)
 5. Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
 6. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
 7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
 8. SSC (10X) (n. di cat. 950-110 / 05353947001)
 9. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)
 10. ultraView Silver Wash II (Pre-dilute) (n. di cat. 780-003 / 05446724001)
 11. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001)
 12. Cell Conditioning Solution (CC2) (n. di cat. 950-123 / 05279798001)
 13. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001)
 14. ULTRA LCS (Pre-dilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001)
 15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001)
 16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (n. di cat. 950-223 / 05424542001)
 17. Strumento BenchMark IHC/ISH
 18. Vetrini per microscopia, caricati positivamente (Superfrost Plus o equivalenti)
 19. Montante permanente*
 20. Coprioggetto sufficiente per coprire il tessuto
 21. Montavetrini automatizzato
 22. HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (n. di cat. 783-4422 / 05640300001), utilizzabile secondo necessità per le attività di risoluzione dei problemi.

* Fare riferimento alla Tabella 30 per informazioni sui montanti permanenti compatibili con questa analisi.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare.
 Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità della sonda, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo dell'erogatore e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.
 Su ogni erogatore di sonda è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il reagente resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza indicata.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) trattati normalmente sono idonei all'uso con questa sonda se usati con uno strumento BenchMark IHC/ISH. Il fissativo per i tessuti consigliato è formalina neutra tamponata (NBF) al 10% per un intervallo compreso tra 6 e 72 ore.²⁰ Con l'esclusione delle analisi VENTANA, gli studi hanno riscontrato che la maggioranza dei risultati FISH non conclusivi per il gene HER2 è correlata a fattori pre-analitici tra cui una fissazione insufficiente o eccessiva,²¹ così come ritardi nella fissazione.²² La rigorosa implementazione di procedure di fissazione (per esempio l'uso di un dispositivo di processazione dedicato per garantire una fissazione di almeno 6 ore) ha determinato una riduzione del 68.5% nei casi non conclusivi, passati dal 10.8% al 3.4%. I campioni fissati in formalina in < 6 ore possono risultare in perdita di segnale e sovradigestione nucleare, come osservato dalla colorazione pallida/debole di ematosillina. L'unica fissazione consigliata è NBF al 10% in quanto alcuni fissativi generano una colorazione variabile con le analisi basate su ISH (inclusi la soluzione di Bouin's e Alcohol Formalin-Acetic Acid (AFA)).²¹

I vetrini devono essere immediatamente colorati, poiché la qualità degli acidi nucleici target nelle sezioni di tessuto tagliate può diminuire con il passare del tempo. Studi interni hanno dimostrato che nel caso di sezioni di tessuto mammario e gastrico tagliate, i vetrini conservati a 2-8 °C possono rimanere stabili per 12 mesi. I vetrini caricati positivamente possono essere suscettibili a sollecitazioni ambientali con conseguente colorazione inadeguata di tutte le analisi ISH (ad esempio, assenza di colorazione o controcolorazione sul tessuto). Richiedere al proprio rappresentante Roche una copia del documento

"Impact of environmental stress on various histology slide types" per comprendere meglio come utilizzare questi tipi di vetrini.

Le sezioni devono essere tagliate allo spessore adeguato (4 µm) per l'analisi e collocate su vetrini per microscopio caricati positivamente (Superfrost Plus o equivalenti). Drenare o asciugare i vetrini per rimuovere l'acqua in eccesso tra vetrino e tessuto.

Sezioni di spessore superiore a 4 µm possono richiedere un trattamento con proteasi più intenso rispetto alla condizione consigliata e possono presentare una maggiore formazione di bolle nei nuclei rispetto a sezioni più sottili a causa dell'eccesso di paraffina nel tessuto. Questo fenomeno si presenta sotto forma di vacuoli o bolle di grandi o piccole dimensioni nei nuclei. Spesso la formazione di bolle nei nuclei si traduce in un ventaglio di effetti sui segnali SISH e Red ISH con le seguenti caratteristiche: 1) nuclei con bolle in cui i segnali SISH e Red ISH sono comunque in posizione centrale nel nucleo e 2) nuclei con bolle che spingono i segnali SISH e Red ISH verso la periferia. Spesso in entrambi i casi, se i segnali SISH e Red ISH sono chiaramente distinguibili, non sono altrimenti distorti e sono ancora enumerabili, il caso può essere valutato. Talvolta, tuttavia, l'estrema intensità del fenomeno di formazione di bolle nei nuclei può distorcere i segnali SISH e Red ISH o renderli impercettibili impedendone l'enumerazione accurata. Ciò si verifica con maggiore frequenza quando i segnali SISH e Red ISH sono spinti verso la periferia del nucleo. In queste circostanze, spesso è possibile trovare nuclei in altre regioni del campione che possono essere enumerati e che consentono quindi la valutazione del caso. Se il grado di formazione di bolle nei nuclei è molto alto, nella misura in cui non è possibile trovare un numero sufficiente di nuclei in cui i segnali SISH e Red ISH possono essere enumerati in modo affidabile, al caso non deve essere assegnata una valutazione. La formazione di bolle nei nuclei può avere luogo anche nel quadro di una fissazione insufficiente (1-3 ore in formalina); in tal caso il fenomeno in genere ha caratteristiche meno distinte. Può essere possibile porvi rimedio nel caso di una fissazione di 3 ore modificando lo smascheramento dell'antigene/il trattamento con proteasi, mentre con una fissazione di 1 ora il fenomeno è probabilmente non risolvibile.

L'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata sviluppata con opzioni di pre-trattamento aggiuntive che possono essere di ausilio nell'ottimizzazione dell'analisi nei diversi laboratori e per la successiva risoluzione dei problemi di particolari tessuti/vetrini che presentano colorazione non ottimale. Si consiglia a ciascun laboratorio di eseguire corse di colorazione iniziali sui campioni di controllo rappresentativi che sono stati preparati nelle medesime condizioni dei campioni clinici da analizzare. Ciò contribuisce ad ottimizzare le condizioni di colorazione specifiche per i singoli laboratori che potrebbero variare nelle proprie procedure di preparazione dei campioni esatte. Fattori pre-analitici diversi da quelli consigliati possono dare luogo a variabilità nei risultati. I campioni la cui preparazione pre-analitica impiega condizioni che differiscono da quelle consigliate potrebbero non dare mai luogo a una colorazione adeguata con l'analisi.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.
3. Non usare oltre il numero di test specificato.
4. **Avvertenza: il prodotto contiene formammide.** La formammide è tossica per inalazione e moderatamente tossica per ingestione. È irritante per la cute, gli occhi e le membrane mucose e viene assorbita attraverso la cute. Può causare danni al feto. Adottare precauzioni durante la manipolazione dei reagenti. Utilizzare guanti monouso e indossare indumenti protettivi adeguati durante la manipolazione di possibili cancerogeni o materiali tossici.
5. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a potenziale rischio biologico e smaltiti adottando precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.^{23,24}
6. Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi e le membrane mucose. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante. Evitare l'inalazione dei reagenti.
7. Assicurarsi che il contenitore dei rifiuti sia vuoto prima di avviare una corsa di colorazione sullo strumento. Se non si prende questa precauzione, il contenitore dei rifiuti potrebbe traboccare e l'utilizzatore rischia di scivolare e cadere.
8. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti poiché può causare risultati non corretti.
9. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento alla guida per l'utilizzatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle istruzioni per l'uso di tutti i componenti necessari disponibili sul sito navifyportal.roche.com.
10. Consultare le autorità locali e/o statali per determinare il metodo di smaltimento consigliato.

11. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.
12. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

Questo prodotto contiene componenti classificati come segue in conformità con il regolamento (CE) n. 1272/2008:

Tabella 1. Informazioni sui pericoli.

Pericolo	Codice	Indicazione
	H351	Sospettato di provocare il cancro.
	H360D	Può nuocere al feto.
	H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
	P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
	P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
	P260	Non respirare nebbia o vapori.
	P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso/Proteggere l'udito.
	P308 + P313	In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico.
	P501	Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto autorizzato per lo smaltimento dei rifiuti.

Questo prodotto contiene la sostanza identificata dal numero 75-12-7: formammide

PROCEDURA DI COLORAZIONE

Le sonde VENTANA sono state sviluppate per l'uso su uno strumento BenchMark IHC/ISH in abbinamento ai kit di rilevazione e agli accessori VENTANA. Le procedure di colorazione per lo strumento BenchMark IHC/ISH con VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit sono elencate in Tabella 2. I protocolli di colorazione consigliati sono elencati in Tabella 3.

È possibile visualizzare, stampare e modificare i parametri delle procedure automatizzate conformemente alla procedura descritta nella guida per l'utilizzatore dello strumento. Fare riferimento alla scheda metodologica del kit di rilevazione VENTANA appropriato per maggiori dettagli.

Per ulteriori informazioni dettagliate sull'uso corretto di questo dispositivo, fare riferimento alla scheda metodologica dell'erogatore in linea associato al codice 800-6043.

Tabella 2. Impiegare le seguenti procedure di colorazione per eseguire l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumenti BenchMark IHC/ISH.

Piattaforma strumentale	Procedura di colorazione
BenchMark GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark ULTRA oppure BenchMark ULTRA PLUS	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

Tabella 3. Condizioni di colorazione consigliate per l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumenti BenchMark IHC/ISH.

Condizione di colorazione	Mammella	Gastrico
Cottura	Non selezionata	Non selezionata

Condizione di colorazione	Mammella	Gastrico
Cell Conditioning 1	16 min	16 min
Cell Conditioning 2	24 min	16 min
ISH Protease 3	20 min	16 min
Temperatura del lavaggio di stringenza	76 °C per strumenti BenchMark GX/XT	76 °C per strumenti BenchMark GX/XT
	74 °C per strumenti BenchMark ULTRA o ULTRA PLUS	74 °C per strumenti BenchMark ULTRA o ULTRA PLUS

A causa della variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, così come della variabilità delle condizioni ambientali e degli strumenti di laboratorio, può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di smascheramento dell'antigene o il pretrattamento con proteasi in base ai singoli campioni.

Avvio di una corsa di colorazione su strumenti BenchMark IHC/ISH

1. Applicare l'etichetta del vetrino con codice a barre corrispondente al protocollo della sonda da eseguire.
2. Caricare quanto segue nel vassoio/nei vassoi reagenti o nel carosello: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, reagenti da VENTANA Red ISH DIG e VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e reagenti ausiliari necessari. Posizionare il vassoio/i vassoi reagenti o il carosello sullo strumento.
3. Controllare i liquidi consumabili e i rifiuti.
4. I flaconi del tampone di reazione devono essere pieni.
5. Il contenitore dei rifiuti deve essere vuoto prima dell'inizio di una corsa di colorazione.
6. Caricare i vetrini nello strumento.
7. Avviare la corsa di colorazione.
8. Al termine della corsa di colorazione, rimuovere i vetrini dallo strumento. Sui vetrini colorati saranno presenti residui di tampone e soluzione coverslip. Procedere con le fasi di risciacquo e disidratazione (fare riferimento al seguito).

Procedura di disidratazione

Nota: Il cromogeno Fast Red è solubile in alcol e acetone. L'esposizione dei vetrini colorati ad alcol e/o acetone può causare una perdita di segnale specifico.

1. Per rimuovere la soluzione coverslip, lavare i vetrini in 2 soluzioni successive di detergente delicato per stoviglie (non usare detergente per lavastoviglie automatiche).
2. Risciacquare i vetrini con acqua distillata per circa 1 minuto. Agitare per rimuovere l'acqua in eccesso.
3. Collocare i vetrini in una stufa (45–60 °C) per l'asciugatura oppure far asciugare all'aria a temperatura ambiente. I tempi di asciugatura in stufa variano tra 10 minuti e un'ora (l'asciugatura dei vetrini colorati per un periodo più lungo non sembra incidere sui risultati della colorazione). Assicurarsi che i vetrini siano completamente asciutti prima del loro montaggio in quanto residui di acqua sugli stessi possono interferire con la procedura di montaggio dei vetrini e provocare la formazione di bolle.
4. Trasferire i vetrini in un bagno di xilene per circa 30 secondi.
5. Collocare i montanti sul vetrino.
6. Applicare il coverslip sul vetrino. Tenere presente che alcuni montanti non sono compatibili con l'analisi e non devono essere usati (fare riferimento alle sezioni Limitazioni e Risoluzione dei problemi).

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Campioni di controllo positivo

I segnali normali *HER2* e Chromosome 17 (1–2 copie per cellula) fungono da controlli positivi interni e devono essere visibili nel campione utilizzando obiettivi da 20x, 40x e/o 60x. A causa dell'eterogeneità biologica, tuttavia, non tutte le cellule presenteranno una singola copia del gene. La colorazione nucleare specifica può essere localizzata in varie cellule, tra cui: fibroblasti stromali, cellule endoteliali, linfociti e cellule epiteliali non

neoplastiche. Se i controlli positivi non presentano colorazione positiva, ciò può essere indice di un problema associato ai reagenti o di natura strumentale. Poiché ogni campione possiede un controllo positivo interno (vale a dire colorazione ISH adeguata nelle cellule normali), ciò funge da vero "controllo positivo".

È possibile utilizzare un campione di controllo positivo specifico per il laboratorio per ogni procedura di colorazione eseguita. I campioni di controllo possono essere campioni preparati in modo identico ai campioni dei pazienti. Tali controlli sono utili per controllare tutte le fasi della procedura, dalla preparazione dei campioni fino alla colorazione. L'uso di un campione preparato in modo diverso dai campioni oggetto del test fornisce un controllo per i reagenti, lo strumento e le procedure ma non per la fissazione né per la processazione dei campioni. I risultati dei campioni oggetto del test devono essere analizzati nella stessa corsa di colorazione. Tali controlli non devono sostituire l'adeguata valutazione dei controlli interni in ciascun campione del paziente.

Campione di xenograft

I vetrini xenograft possono essere utili per una convalida primaria del metodo usato per la colorazione dei vetrini con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Sono inoltre consigliati come ausilio alla risoluzione dei problemi, se impiegati in corse di colorazione contenenti campioni clinici. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla scheda metodologica del vetrino xenograft appropriato.

Discrepanze inspiegabili

Eventuali discrepanze inspiegabili nei controlli devono essere immediatamente riferite al rappresentante dell'assistenza locale. Se i risultati del controllo qualità non soddisfano le specifiche, i risultati dei pazienti non sono validi. Vedere la sezione Risoluzione dei problemi di questa scheda metodologica. Identificare e correggere il problema e ripetere quindi l'analisi dei campioni del paziente.

Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di una sonda o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità della sonda effettuando l'analisi su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali ISH note (fare riferimento alla scheda metodologica della sonda e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist²⁵ o a CLSI Approved Guideline²⁶ oppure a entrambi i documenti). Ripetere queste procedure di controllo qualità per ciascun nuovo lotto di reagente od ogni volta che si modificano i parametri dell'analisi.

INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE/RISULTATI PREVISTI

Il pattern di colorazione cellulare dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è di tipo nucleare.

Un patologo qualificato con esperienza nell'interpretazione al microscopio di campioni di anatomia patologica, procedure ISH e riconoscimento di copie singole e amplificate del gene *HER2* e di Chromosome 17 (Chr17) (che richiede l'esame al microscopio utilizzando obiettivi da 20x, 40x e/o 60x) dovrà valutare i controlli prima dell'interpretazione dei risultati.

Nota: non è consigliato l'uso di un obiettivo da 100x. Tutti i vetrini di tessuti letti nel corso dei test di verifica e convalida del design sono stati condotti con obiettivi da 20x, 40x e/o 60x.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail deve essere usato congiuntamente alla Guida all'interpretazione VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail [codice 1018386] per la valutazione dei vetrini.

Le sezioni seguenti descrivono come interpretare e valutare i vetrini. In Tabella 4 è illustrato come contare i segnali distinti.

Definizioni

1. Stato del gene *HER2*. Lo stato del gene *HER2* è una funzione del rapporto tra il numero di copie del gene *HER2* e il numero di copie del cromosoma Chr17, per cellula, in un caso di carcinoma mammario o GEA invasivo. Lo stato del gene *HER2* è classificato utilizzando le seguenti linee guida:
 - a. Un rapporto $HER2/Chr17 \geq 2.0$ indica amplificazione
 - b. Un rapporto $HER2/Chr17 < 2.0$ indica non amplificazione
2. Adeguatezza del vetrino. Un vetrino VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail deve soddisfare tre criteri per essere considerato adeguato per l'enumerazione; se il vetrino non soddisfa tali criteri, non può essere enumerato e il risultato è insoddisfacente.

- a. Controllo positivo interno. I segnali *HER2* e Chr17 normali (1–2 copie per cellula) fungono da controlli positivi interni e devono essere visibili nel campione. Questa colorazione nucleare può essere localizzata in varie cellule non neoplastiche, tra cui: fibroblasti stromali, cellule endoteliali, linfociti e cellule epiteliali non neoplastiche.
 - b. Cellule neoplastiche. Utilizzando obiettivi da 20x, 40x e/o 60x, l'aspetto invasivo del tumore deve presentare un campo enumerabile di segnali SISH e Red ISH.
 - c. Fondo. Qualsiasi colorazione di fondo derivante da sistemi di rilevazione SISH o Red ISH dovrà essere valutata per determinare se interferisce con l'enumerazione dei segnali SISH o Red ISH specifici. Il fondo SISH solitamente appare come "polvere" SISH distinguibile dal segnale specifico. Il fondo Red può apparire come un velo rosso o raramente come segnali non specifici a intensità ridotta rispetto al segnale specifico.
3. Aree target per l'enumerazione dei segnali. Un'area target accettabile all'interno del carcinoma invasivo presenta un campo enumerabile di segnali SISH e Red ISH. L'enumerazione dei segnali non deve essere eseguita nelle aree contenenti segnali SISH o Red ISH deboli, nuclei compressi o sovrapposti o necrosi. Se un'area target è considerata inadeguata per l'enumerazione, spesso è possibile individuarne altre sullo stesso vetrino che sono invece adeguate. Ciò può essere stabilito in base alla presenza di cellule normali che presentano un'adeguata colorazione SISH e Red ISH nell'area target o in adiacenza di quest'ultima.

Osservazioni aggiuntive per *HER2* e Chromosome 17

Ulteriori osservazioni possono essere annotate come commenti nel referto del patologo.

1. Eterogeneità: In alcuni casi il tessuto può contenere aree di carcinoma geneticamente eterogenee relativamente al numero di copie di *HER2* (ossia, può esservi una varietà di nuclei amplificati e non amplificati o una varietà di nuclei contenenti varie copie di *HER2*). Questo si può osservare tra le cellule di carcinoma all'interno dell'area target stessa o tra due diverse aree target.
2. L'aneusomia è una qualsiasi affezione in cui un organismo possiede un numero di specifici cromosomi superiore o inferiore al normale, ossia il numero di un particolare cromosoma (in questo caso Chromosome 17) non è diploide. Nella polisomia, possono essere presenti tre o più copie di cromosomi piuttosto che le due copie previste. Nella monosomia le cellule tumorali possono presentare una sola copia di Chromosome 17. Sono state segnalate l'apparente "amplificazione", cluster o polisomia di Chromosome 17 (con o senza cluster SISH *HER2*).²⁷ Nei casi che presentano cluster di *HER2* e Chromosome 17, è necessario prestare attenzione a non considerarli con un rapporto ~ 1.0. In questi casi, il patologo deve fare riferimento ai risultati di immunistoichimica (IHC) per le analisi di sovraespressione della proteina *HER2*, in quanto la maggioranza tende ad essere 3+.
3. Delezione monoallelica: La delezione del gene *HER2* da Chromosome 17 nelle cellule tumorali ha come risultato un rapporto *HER2*/Chr17 < 1.0.

Visualizzazione dei segnali

I segnali SISH e Red ISH sono visualizzati come:

1. Copia singola. Un punto nero distinto (SISH) è contato come una copia singola di *HER2*. Punti singoli distinti visualizzati nei nuclei di controllo interno (non neoplastici) sono rappresentativi delle dimensioni di una copia singola nelle cellule di carcinoma invasivo per il segnale SISH (nero). Per i segnali Red ISH, ogni segnale distinto è contato come una copia. Tenere presente che il segnale Red ISH da Chr17 può apparire più grande dei segnali SISH e talvolta di forma allungata. Può formarsi un velo rosa che non deve essere confuso con il segnale. I segnali Red di colore molto chiaro rispetto al segnale dei nuclei di controllo positivo interno e al pattern di colorazione complessivo non devono essere enumerati in quanto potrebbero essere non specifici. I segnali rossi specifici presentano margini distinti, come mostrato in Tabella 4.
2. Copie multiple. Segnali SISH singoli distinti visualizzati nei nuclei di controllo positivo interno sono rappresentativi delle dimensioni di una copia singola di *HER2* nelle cellule di carcinoma invasivo. La dimensione dei segnali SISH singoli è utilizzata come riferimento per determinare il numero relativo di copie amplificate nei nuclei delle cellule cancerogene. Per i segnali Red ISH, ogni segnale distinto è contato come una copia.
3. Cluster. Presenza di più segnali sovrapposti nei nuclei che non possono essere enumerati. Un cluster è definito come la sovrapposizione nei nuclei di numerosi segnali SISH che non è possibile distinguere individualmente. I cluster di *HER2* possono essere stimati esclusivamente dal patologo. Per esempio, un ampio

cluster di più segnali SISH potrebbe essere stimato come 12 copie, mentre cluster più piccoli potrebbero essere stimati come 6 copie. La stima viene effettuata utilizzando come riferimento le copie SISH singole presenti nelle cellule di controllo positivo interno. La presenza di cluster *HER2* viene annotata sulla scheda di valutazione.

4. Nuclei sovrapposti, nuclei con un solo colore presente e campioni con colorazione non specifica non devono essere enumerati. Qualsiasi nucleo con segnali Red ISH e SISH sovrapposti non distinguibili deve essere visualizzato a un ingrandimento più alto per distinguere i due segnali oppure non deve essere contato. I nuclei il cui aspetto presenta bolle non devono essere contati.

Enumerazione dei segnali SISH e Red ISH per determinare lo stato del gene *HER2*

Esaminare il vetrino colorato H&E per individuare le aree contenenti carcinoma mammario o gastroesofageo invasivo. Esaminare il vetrino colorato *HER2* Dual ISH corrispondente all'H&E e identificare un'area target di carcinoma mammario o gastroesofageo invasivo. Prima di enumerare i segnali *HER2* e Chromosome 17 per determinare lo stato del gene *HER2*, è fondamentale determinare se l'area target invasiva (il tessuto della lesione) è colorata adeguatamente e soddisfa i criteri descritti relativamente all'adeguatezza del vetrino (vedere la precedente sezione Definizioni, 2. Adeguatezza del vetrino).

L'algoritmo di valutazione sviluppato per l'analisi massimizza precisione ed efficienza del conteggio. Devono essere enumerati venti nuclei, ciascuno contenente segnali rossi (Red ISH) e neri (SISH).

Criteri di selezione cellulare

Contare solo i nuclei i cui diametri sono rappresentativi della popolazione media dei nuclei di carcinoma invasivo nell'area target. Non contare i segnali nei nuclei che sono:

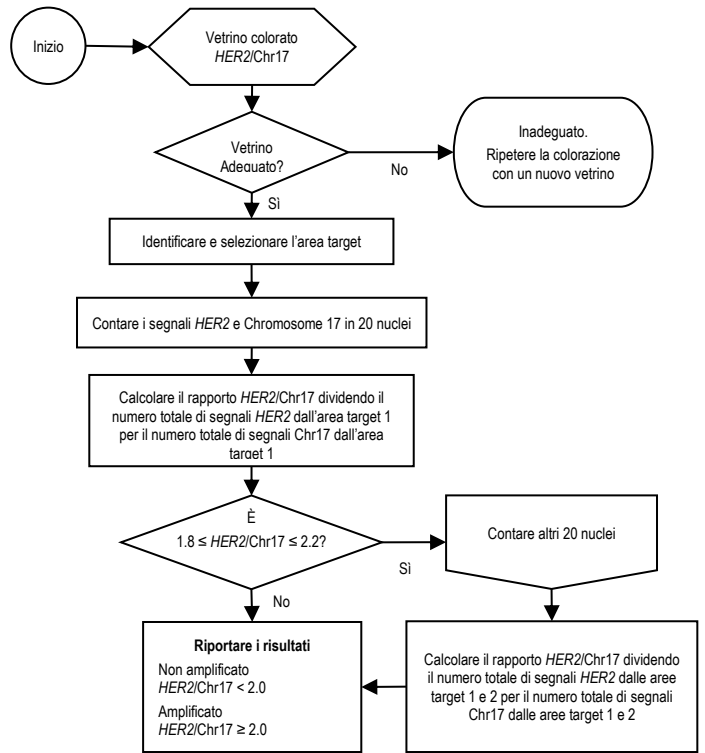
1. Di diametro molto maggiore rispetto alle dimensioni medie dei nuclei di carcinoma
 2. Di diametro molto minore rispetto alle dimensioni medie dei nuclei di carcinoma
- Contare solo i nuclei che sono rappresentativi della popolazione dei nuclei di carcinoma invasivo con il più alto numero medio di segnali (sia SISH che Red ISH).

Nelle aree target geneticamente eterogenee relativamente al numero di copie di *HER2*, contare solo i nuclei che sono rappresentativi della popolazione dei nuclei di carcinoma invasivo con il più alto numero medio di segnali (sia SISH che Red ISH). Prestare attenzione che l'eterogeneità è presente nella scheda di valutazione.

Tabella 4. Visualizzazione dei segnali.

	Non contare se i nuclei si sovrappongono.
	Non contare se non è presente alcun segnale.
	Non contare se è presente solo segnale di un colore.
	Non contare se i segnali sono all'esterno dei nuclei.
	Contare come 1 segnale nero (<i>HER2</i>) e 1 rosso (Chr17).
	Contare come 2 segnali neri (<i>HER2</i>) e 2 rossi (Chr17).

	Contare come 1 segnale nero (<i>HER2</i>) e 2 rossi (Chr17). Il segnale nero è un "doppietto". Contare due segnali adiacenti dello stesso colore solo se la distanza tra i segnali è pari o superiore al diametro di un segnale singolo.
	Cluster SISH di piccole dimensioni possono essere stimati solo utilizzando le dimensioni di un segnale singolo come riferimento. Usare le cellule stromali per stimare le dimensioni del segnale (cellula più piccola). Per esempio, questo cluster potrebbe essere stimato come 6 segnali SISH; sommando gli altri 2 segnali singoli si ottiene un conteggio totale pari a 8. Contare come 2 segnali rossi. Annotare sulla scheda di valutazione la presenza cluster per <i>HER2</i> .
	Stimare il cluster di grandi dimensioni. In questo caso il cluster potrebbe essere stimato come 12 segnali neri; sommando gli altri 4 segnali singoli si ottiene un conteggio totale pari a 16. Contare i segnali rossi come 2 copie di Chr17. Annotare sulla scheda di valutazione la presenza cluster per <i>HER2</i> .
	Un segnale rosso vicino a un segnale nero deve essere contato come un solo segnale rosso e un solo segnale nero. In questo caso per distinguerli può essere necessario eseguire l'enumerazione con un obiettivo da 60x. Pertanto, contare come 4 segnali neri (<i>HER2</i>) e 2 rossi (Chr17). Se non è possibile distinguere i segnali sovrapposti, non contare lo specifico nucleo.
	Cluster di punti neri che oscura uno o più segnali rossi. È possibile impiegare un ingrandimento più alto (60x) nel tentativo di confermare la presenza o assenza di uno o più segnali rossi; in caso contrario, non contare: contare sempre i nuclei con segnali rossi chiaramente distinguibili. Annotare sulla scheda di valutazione la presenza di cluster SISH. I nuclei con segnale rosso visibile e in più alto numero devono essere valutati nei nuclei con i cluster SISH.
	Se nei nuclei compare "polvere" SISH di fondo, contare solo se gli specifici segnali SISH sono chiaramente distinguibili dal fondo.
	Può essere osservato un velo rosa che non deve essere confuso con il segnale. Possono essere osservati deboli e piccoli segnali Red ISH che potrebbero rappresentare il legame non specifico della sonda Chr17 ad altri cromosomi. L'immagine mostra 2 distinti segnali rossi (Chr17) e 2 neri (<i>HER2</i>).



Controlli

Le cellule normali all'interno dell'area target o adiacenti a quest'ultima fungono da controlli interni della colorazione. Almeno il 50% dei nuclei delle cellule normali dovrebbe contenere almeno un segnale SISH e almeno il 50% dovrebbe contenere almeno un segnale Red ISH (non è necessario che i segnali SISH e Red ISH provengano dalle stesse cellule) affinché l'area target possa essere ritenuta adeguata. La mancata identificazione di segnale adeguato in cellule normali su qualsiasi vetrino della corsa di colorazione indica che il particolare vetrino è inadeguato per l'enumerazione. L'uso di campioni di controllo positivo o vetrini xenograft è di ausilio nella risoluzione dei potenziali problemi dovuti allo strumento o ai reagenti.

LIMITAZIONI

Limitazioni generali

1. L'ISH è una metodologia a più fasi che necessita di formazione specialistica nella scelta dei reagenti appropriati, nella preparazione dei campioni, nella processazione, nella preparazione del vetrino per ISH e nell'interpretazione dei risultati.
2. La colorazione dei tessuti dipende dalla loro manipolazione e processazione prima della colorazione. Condizioni inappropriate di fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionamento o la contaminazione con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento di reagente e risultati falsi negativi o falsi positivi. Variazioni nella fissazione e nei metodi di inclusione o le irregolarità intrinseche del tessuto possono provocare risultati incoerenti.
3. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
4. L'interpretazione clinica della colorazione deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. È responsabilità del patologo qualificato aver acquisito familiarità con i reagenti e i metodi utilizzati per produrre il preparato colorato. È necessario eseguire la colorazione in un laboratorio certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo responsabile della revisione dei vetrini colorati e che garantisca l'adeguatezza dei controlli.

Stato del gene *HER2*: algoritmo di valutazione per VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail

Devono essere enumerati venti nuclei (ciascuno contenente segnali rossi (Chr17) e neri (*HER2*)). I risultati finali dello stato *HER2* sono riportati in base al rapporto ottenuto dividendo la somma dei segnali *HER2* per tutti i 20 nuclei per la somma dei segnali di Chromosome 17 per tutti i 20 nuclei. Lo stato di amplificazione è definito come amplificato se il rapporto *HER2*/Chr17 è ≥ 2.0 e come non amplificato se il rapporto *HER2*/Chr17 è < 2.0 . Se il rapporto *HER2*/Chr17 è compreso tra 1.8 e 2.2, è necessario enumerare altri 20 nuclei. Deve quindi essere calcolato un nuovo rapporto tenendo conto di tutti i 40 nuclei e lo stato di amplificazione deve essere riportato come descritto in precedenza.

- I reagenti VENTANA sono forniti a una diluizione ottimale per l'uso, purché le istruzioni fornite siano rispettate. Qualsiasi deviazione dalle procedure di test consigliate può inficiare i risultati attesi. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati dei pazienti.
- A causa della variabilità nella processazione dei campioni può essere necessario aumentare o diminuire il tempo di trattamento con la proteasi ISH. Inoltre, l'incremento o la diminuzione dello smascheramento dell'antigene incide sui risultati della colorazione. Tali modifiche devono essere convalidate dall'utilizzatore. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate sono responsabili per l'interpretazione dei risultati del paziente in tali circostanze.
- I reagenti possono dare luogo a reazioni inattese in tessuti non testati precedentemente. La possibilità di reazioni inattese, anche in gruppi di tessuti già esaminati, non può essere completamente esclusa a causa della variabilità biologica dei tessuti. Contattare il rappresentante dell'assistenza locale per segnalare reazioni inattese documentate.

LIMITAZIONI SPECIFICHE

- Non tutti i fissativi sono compatibili con l'analisi. Il fissativo consigliato è NBF al 10% per un periodo compreso tra 6 e 72 ore.
- L'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata sviluppata per la colorazione di sezioni di tessuto tagliate a uno spessore di ~ 4 µm.²⁰ Sezioni più spesse di 4 µm possono essere soggette a perdita di tessuto.
- Non tutte le analisi potrebbero essere registrate su ogni strumento. Contattare il rappresentante dell'assistenza locale per ulteriori informazioni.
- Ossidazione, scolorimento e/o scomparsa del segnale SISH possono essere dovute all'uso di determinate marche di montanti. Fare riferimento alla Tabella 30 per la compatibilità dei montanti.
- Per prevenire la dissoluzione del segnale Red ISH, i vetrini colorati non devono essere immersi in bagni di alcol o acetone per la disidratazione. Si consiglia l'asciugatura all'aria o in una stufa. I vetrini colorati devono essere completamente asciutti prima del montaggio.
- Come in qualsiasi altro test, un risultato negativo indica che il target specifico non è stato rilevato, non che il target specifico era assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti all'analisi.
- Questa sonda è stata ottimizzata per l'uso con i reagenti VENTANA su strumenti BenchMark IHC/ISH. Gli utilizzatori che modificano le procedure di test consigliate sono responsabili per l'interpretazione dei risultati del paziente in tali circostanze.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le prestazioni di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sono state valutate mediante studi analitici e clinici. Tutte le procedure di colorazione sono state eseguite utilizzando il protocollo VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail come indicato in Tabella 3 su strumenti BenchMark IHC/ISH salvo diversa indicazione.

La Tabella 5 e la Tabella 6 riepilogano i dati delle prestazioni di questi studi: studi di concordanza, ripetibilità e precisione, precisione intra-patologo e tra patologi, precisione da lotto a lotto, precisione inter-laboratorio dello strumento, sensibilità e specificità analitiche, caratterizzazione dell'analisi e stabilità. Le sezioni seguenti descrivono con maggiori dettagli un sotto gruppo di questi studi.

Tabella 5. Riepilogo dei risultati prestazionali (carcinoma mammario) negli studi analitici e clinici.

Su-pera-men-to	Man-cato supe-ra-men-to	Totale	Modalità di errore			
			HER2/Chr17 deboli/assenti (controllo interno o cellule target)	Errori del fondo	Assenza di tessuto	Altro
2893	127	3020	113 (3.74%)	5 (0.17%)	6 (0.20%)	3 (0.10%)

Tabella 6. Riepilogo dei risultati prestazionali (gastrico) negli studi analitici e clinici.

Su-pera-men-to	Man-cato supe-ra-men-to	Totale	Modalità di errore			
			HER2/Chr17 deboli/assenti (controllo interno o cellule target)	Errori del fondo	Assenza di tessuto	Altro
1340	17	1357	17 (1.25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

PRESTAZIONI CLINICHE

Studio di concordanza con l'analisi PathVysion: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumento BenchMark ULTRA rispetto ad Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Per valutare la concordanza dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail rispetto al dispositivo di confronto, Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit, nella determinazione dello stato del gene *HER2* nel carcinoma mammario invasivo, è stato condotto uno studio di concordanza multicentrico. Tre laboratori centrali hanno partecipato alla valutazione dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Seicentotrentasei casi di carcinoma mammario invasivo umano sono stati forniti da tre centri di arruolamento clinico per la loro potenziale inclusione nello studio in base all'espressione della proteina HER2 precedentemente ottenuta tramite IHC. Lo sponsor dello studio ha fornito ulteriori 133 casi. I laboratori centrali che hanno condotto l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e l'analisi PathVysion HER-2 FISH erano in cieco rispetto allo stato IHC e all'identificatore originale del caso per evitare bias nella valutazione dei campioni. Un laboratorio centrale ha eseguito la colorazione IHC su tutti i campioni usando PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (anticorpo PATHWAY anti-HER2 (4B5)) per le analisi aggiuntive. I risultati della colorazione con l'analisi FISH e VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sono stati enumerati contando almeno 20 nuclei in ciascun campione. I risultati sono stati riportati come segue: rapporto *HER2*/Chr 17 ≥ 2.0 come amplificato; *HER2*/Chr 17 < 2.0 come non amplificato. Tra i 678 casi colorati sia con l'analisi FISH sia con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, è stato possibile enumerare 605 campioni con entrambe le analisi; tali campioni sono pertanto stati inclusi nell'analisi dei tassi di concordanza.

Risultati primari

L'analisi primaria ha confrontato i tassi di concordanza percentuale positiva e negativa per valutare la concordanza tra le analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e PathVysion HER-2 FISH nel carcinoma mammario. I dati per le valutazioni cliniche di amplificato e non amplificato per ciascuna analisi, i dati riuniti ottenuti da tutti i centri, sono illustrati nella tabella seguente 2x2 assieme ai tassi di concordanza percentuale positiva e negativa in cui PathVysion HER-2 FISH è l'analisi di riferimento. I criteri di accettabilità per dimostrare le prestazioni equivalenti di questi due metodi di analisi quando si utilizza lo strumento BenchMark ULTRA richiedevano, riunendo dati da tutti e tre i centri, limiti inferiori all'85% o superiori dell'intervallo di confidenza bilaterale al 95% del punteggio. Tali criteri di accettabilità sono stati soddisfatti (Tabella 7). Inoltre, tutti i tassi di concordanza positiva e negativa in base al centro sono risultati superiori all'85% (Tabella 8).

Tabella 7. Concordanza tra VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit in una coorte di campioni di carcinoma mammario umano.

Risultato VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Risultato PathVysion HER-2 FISH		
	Amplificato	Non amplificato	Totale
Amplificato	270	12	282
Non amplificato	32	291	323

Risultato VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Risultato PathVysion HER-2 FISH		
	Amplificato	Non amplificato	Totale
Totale	302	303	605
	n/N	% (CI del punteggio al 95%)	
Concordanza percentuale positiva	270/302	89.4 (85.4, 92.4)	
Concordanza percentuale negativa	291/303	96.0 (93.2, 97.7)	

Tabella 8. Riepilogo dei tassi di concordanza negativa, positiva e complessiva per VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit su campioni di carcinoma mammario umano, suddivisi per centro.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail rispetto a PathVysion HER-2 FISH	Concordanza percentuale positiva	Concordanza percentuale negativa	Concordanza percentuale complessiva
Centro A: n/N (%) (CI al 95%)	92/100 (92.0%) (85.0, 95.9)	92/93 (98.9%) (94.2, 99.8)	184/193 (95.3%) (91.4, 97.5)
Centro B: n/N (%) (CI al 95%)	93/103 (90.3%) (83.0, 94.6)	108/119 (90.8%) (84.2, 94.8)	201/222 (90.5%) (86.0, 93.7)
Centro C: n/N (%) (CI al 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)

Questi dati indicano un'eccellente concordanza tra l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e PathVysion HER-2 FISH Kit nella determinazione dello stato del gene *HER2* in campioni di carcinoma mammario umano.

Risultati secondari

La concordanza percentuale complessiva tra VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e PathVysion HER-2 FISH Kit e il suo CI bilaterale al 95% del punteggio, riunendo dati da tutti i centri clinici, è risultata pari a 92.7% (90.4, 94.5).

Risultati secondari: IHC rispetto a ISH relativamente allo stato HER2

Lo studio di concordanza per il confronto tra VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e PathVysion FISH è stato progettato anche per valutare i casi in base ai rispettivi punteggi IHC per i livelli di proteina HER2 (vedere la scheda metodologica dell'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) [codice 14427EN], per l'assegnazione dei punteggi IHC). Ciò ha consentito un'analisi secondaria per confrontare i tassi di concordanza tra l'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) e l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e tra l'anticorpo PATHWAY anti-HER2 (4B5) e l'analisi PathVysion FISH. In questo studio i punteggi IHC 2+/3+ sono stati considerati positivi per la sovraespressione di HER2. I dati di concordanza per l'analisi PathVysion HER-2 FISH e l'anticorpo PATHWAY HER2/neu (4B5) sono mostrati in Tabella 9. I dati di concordanza per l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e l'anticorpo PATHWAY HER2/neu (4B5) sono mostrati in Tabella 10.

Tabella 9. Confronto tra IHC sullo strumento BenchMark ULTRA e FISH: dati riuniti da tutti i centri.

		Risultato PathVysion HER-2 FISH		
		Amplificato	Non amplificato	Totale
Risultati dell'anticorpo	Positivo (casi 2+/3+)	277	63	340

		Risultato PathVysion HER-2 FISH		
		Amplificato	Non amplificato	Totale
PATHWAY HER2 (4B5)	Negativo (0/1+)	27	238	265
	Totale	304	301	605
		n/N	% (CI del punteggio al 95%)	
Concordanza percentuale positiva		277/304	91.1 (87.4, 93.8)	

Tabella 10. Confronto tra IHC sullo strumento BenchMark ULTRA e analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail: dati riuniti da tutti i centri.

		Risultato VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail		
		Amplificato	Non amplificato	Totale
Risultati dell'anticorpo PATHWAY HER2 (4B5)	Positivo (casi 2+/3+)	248	78	326
	Negativo (0/1+)	18	253	271
	Totale	266	331	597
		n/N	% (CI del punteggio al 95%)	
Concordanza percentuale positiva		248/266	93.2 (89.6, 95.7)	

Studio di concordanza: analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumento BenchMark ULTRA rispetto all'analisi Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

È stato condotto uno studio di concordanza per valutare l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail rispetto a Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit per l'ibridazione in situ fluorescente (FISH) nella determinazione dello stato del gene *HER2* nei casi di GEA. La comparabilità dell'analisi su campioni GEA è stata determinata confrontando i risultati della colorazione ottenuti dalle due analisi (Tabella 11). Centotrentaquattro (134) campioni GEA umani (un insieme di casi amplificati e non amplificati) sono stati colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. La stessa coorte è stata colorata con l'analisi Dako HER2 IQFISH pharmDx™. I risultati che presentavano tassi di concordanza negativa, positiva e complessiva per i 146 campioni clinici di questa coorte che erano enumerabili sia con l'analisi Dako HER2 IQFISH pharmDx™ che con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sono mostrati in Tabella 11 e Tabella 12.

Tabella 11. Concordanza tra VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e l'analisi Dako HER2 IQFISH pharmDx™ in una coorte di campioni di GEA umano.

Stato dell'amplificazione VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Stato dell'analisi Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Stato dell'amplificazione	
	Amplificato	Non amplificato
Amplificato	49	8
Non amplificato	5	84

Tabella 12. Riepilogo dei tassi di concordanza negativa, positiva e complessiva per VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail e Dako HER2 IQFISH pharmDx™ su campioni GEA umani.

	Negativo		Positivo		Complessivo	
	Tasso di concordanza		Tasso di concordanza		Tasso di concordanza	
	Dati grezzi/ n. di casi	percentuale (CI del punteggio al 95%)	Dati grezzi/ n. di casi	percentuale (CI del punteggio al 95%)	Dati grezzi/ n. di casi	percentuale (CI del punteggio al 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)

PRESTAZIONI ANALITICHE

Ripetibilità e precisione dello strumento BenchMark IHC/ISH con il carcinoma mammario

La ripetibilità e la precisione di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sono state valutate su strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento a VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione è stata valutata utilizzando 28 campioni di carcinoma mammario. Due vetrini replicati da ciascun campione sono stati colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su un singolo strumento BenchMark ULTRA, BenchMark XT o BenchMark GX. Per l'analisi dei dati degli strumenti BenchMark XT e GX, i casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza.

Anche la precisione intermedia tra giorni è stata valutata utilizzando campioni di carcinoma mammario. Vetrini replicati da ciascuno dei 28 campioni sono stati colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumenti BenchMark IHC/ISH in 5 giorni non consecutivi. Per l'analisi dei dati degli strumenti BenchMark XT e BenchMark GX, i casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione è stata determinata con la concordanza positiva media (APA), la concordanza negativa media (ANA) e la concordanza percentuale complessiva (OPA). La precisione intermedia tra giorni è stata determinata con concordanza percentuale positiva (PPA), concordanza percentuale negativa (NPA) e concordanza percentuale complessiva (OPA) su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. Un riepilogo dei risultati di entrambi gli studi è riportato in Tabella 13.

Tabella 13. Ripetibilità intra-corsa di colorazione e precisione intermedia tra giorni dello strumento BenchMark IHC/ISH.

Piattaforma	Ripetibilità/precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
ULTRA	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	194/194	100	(98.1, 100)
		Non amplificato	ANA	186/186	100	(98.0, 100)
		Totale	OPA	190/190	100	(98.0, 100)
ULTRA	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	139/139	100	(97.3, 100)
		Non amplificato	NPA	135/135	100	(97.2, 100)
		Totale	OPA	274/274	100	(98.6, 100)
XT	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplificato	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)

Piattaforma	Ripetibilità/precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
		Totale	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplificato	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Totale	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)
GX	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplificato	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Totale	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Non amplificato	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Totale	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione intermedia fra gli strumenti con carcinoma mammario

La precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata colorando vetrini replicati di 28 campioni di carcinoma mammario su 3 strumenti BenchMark IHC/ISH con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La precisione intermedia fra gli strumenti è stata determinata con PPA, NPA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza (strumenti BenchMark XT/BenchMark GX). Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 14.

Tabella 14. Precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark IHC/ISH.

Piattaforma	Precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
ULTRA	Precisione intermedia fra gli strumenti	Amplificato	PPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Non amplificato	NPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Totale	OPA	168/168	100	(97.8, 100)
XT	Precisione intermedia fra gli strumenti	Amplificato	PPA	77.3/77.3	100	(95.3, 100)
		Non amplificato	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Totale	OPA	168.0/168.0	100	(97.8, 100)

Piattaforma	Precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
GX	Precisione intermedia fra gli strumenti	Amplificato	PPA	76.2/76.2	100	(95.2, 100)
		Non amplificato	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Totale	OPA	166.9/166.9	100	(97.8, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione intra-patologo e tra patologi con carcinoma mammario

La precisione intra-patologo e tra patologi dello strumento BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata facendo valutare a tre patologi 60 campioni di carcinoma mammario colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit su uno strumento BenchMark ULTRA. Per la precisione intra-patologo, lo stesso gruppo di vetrini è stato letto due volte dopo un minimo di due settimane tra le letture. La precisione intra-patologo e tra patologi è stata determinata con APA, ANA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 15.

Tabella 15. Precisione intra-patologo e tra patologi dello strumento BenchMark ULTRA.

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Intra-patologo	Amplificato	APA	178/181	98.3	(96.3, 100)
	Non amplificato	ANA	174/177	98.3	(96.1, 100)
	Totale	OPA	176/179	98.3	(96.1, 100)
Tra patologi	Amplificato	APA	350/362	96.7	(93.2, 99.4)
	Non amplificato	ANA	342/354	96.6	(92.8, 99.4)
	Totale	OPA	346/358	96.6	(92.8, 99.4)

Nota: Gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili. Nello studio sono stati inclusi sei casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione fra le piattaforme con carcinoma mammario

La precisione fra le piattaforme dello strumento BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata valutando 28 campioni di carcinoma mammario colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit su strumenti BenchMark IHC/ISH. La precisione tra le piattaforme è stata determinata con PPA, NPA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza. Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 16.

Tabella 16. Precisione fra le piattaforme dello strumento BenchMark IHC/ISH.

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Precisione fra le piattaforme	Amplificato	PPA	230.8/230.8	100	(98.4, 100)
	Non amplificato	NPA	271.0/272.2	99.6	(98.3, 100)
	Totale	OPA	501.8/502.9	99.8	(99.2, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Strumento BenchMark IHC/ISH: ripetibilità e precisione con adenocarcinoma gastrico

La ripetibilità e la precisione di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sono state valutate sugli strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento a VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione è stata valutata utilizzando quattordici campioni di adenocarcinoma gastrico. Due vetrini replicati da ciascuno dei campioni di adenocarcinoma gastrico sono stati colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su un singolo strumento BenchMark IHC/ISH. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza.

Anche la precisione intermedia tra giorni è stata valutata utilizzando quattordici campioni di adenocarcinoma gastrico. Vetrini replicati da ciascuno dei quattordici campioni sono stati colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su strumenti BenchMark IHC/ISH in 5 giorni non consecutivi. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza.

La ripetibilità intra-corsa di colorazione è stata determinata con la concordanza positiva media (APA), la concordanza negativa media (ANA) e la concordanza percentuale complessiva (OPA). La precisione intermedia tra giorni è stata determinata con concordanza percentuale positiva (PPA), concordanza percentuale negativa (NPA) e concordanza percentuale complessiva (OPA) su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. Un riepilogo dei risultati di entrambi gli studi è riportato in Tabella 17.

Tabella 17. Strumento BenchMark IHC/ISH: ripetibilità intra-corsa di colorazione e precisione intermedia tra giorni.

Piattaforma	Ripetibilità/precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
ULTRA	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplificato	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Totale	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
ULTRA	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplificato	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Totale	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)

Piattaforma	Ripetibilità/precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
XT	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplificato	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Totale	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
XT	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Non amplificato	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Totale	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Ripetibilità intra-corsa di colorazione	Amplificato	APA	64.6/65.1	99.1	(95.9, 100)
		Non amplificato	ANA	70.0/70.6	99.2	(95.2, 100)
		Totale	OPA	67.3/67.9	99.2	(96.9, 100)
GX	Precisione intermedia tra giorni	Amplificato	PPA	67.3/67.9	99.2	(96.5, 100)
		Non amplificato	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Totale	OPA	137.3/137.9	99.6	(98.5, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi due casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione intermedia fra gli strumenti con adenocarcinoma gastrico

La precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata colorando vetrini replicati di quattordici campioni di adenocarcinoma gastrico su 3 strumenti BenchMark IHC/ISH con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. La precisione intermedia fra gli strumenti è stata determinata con PPA, NPA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza. Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 18.

Tabella 18. Precisione intermedia fra gli strumenti BenchMark IHC/ISH.

Piattaforma	Precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
ULTRA	Precisione intermedia fra gli strumenti	Amplificato	PPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Non amplificato	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Totale	OPA	84.0/84.0	100	(95.6, 100)
XT	Precisione intermedia	Amplificato	PPA	40.4/40.9	98.6	(94.1, 100)

Piattaforma	Precisione	Stato clinico	Concordanza			
			Tipo	n/N	%	CI al 95%
	fra gli strumenti	Non amplificato	NPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Totale	OPA	81.3/81.9	99.3	(97.5, 100)
GX	Precisione intermedia fra gli strumenti	Amplificato	PPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Non amplificato	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Totale	OPA	82.9/82.9	100	(95.6, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi due casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione intra-patologo e tra patologi con adenocarcinoma gastrico

La precisione intra-patologo e tra patologi dello strumento BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata facendo valutare a tre patologi 28 campioni di adenocarcinoma gastrico colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit su uno strumento BenchMark ULTRA. Tutti i vetrini sono stati randomizzati e mascherati per la diagnosi dei casi. Per la precisione intra-patologo, lo stesso gruppo di vetrini è stato letto due volte dopo un minimo di due settimane tra le letture. La precisione intra-patologo e la precisione tra patologi è stata determinata con APA, ANA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 19.

Tabella 19. Precisione intra-patologo e tra patologi dello strumento BenchMark ULTRA.

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra patologi	Amplificato	APA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Non amplificato	ANA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Totale	OPA	80/84	95.2	(90.5, 100)
Intra-patologo	Amplificato	APA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Non amplificato	ANA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Totale	OPA	82/84	97.6	(95.2, 100)

Nota: Gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili. Nello studio sono stati inclusi due casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione fra le piattaforme con adenocarcinoma gastrico

La precisione fra le piattaforme dello strumento BenchMark IHC/ISH di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata valutando quattordici campioni di adenocarcinoma gastrico colorati con VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail utilizzando VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit su strumenti BenchMark IHC/ISH. La precisione tra le piattaforme è stata determinata con PPA, NPA e OPA su tutte le osservazioni ottenute dalla popolazione valutabile. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza. Un riepilogo dei risultati di questo studio è disponibile in Tabella 20.

Tabella 20. Strumento BenchMark IHC/ISH: precisione fra le piattaforme.

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Precisione fra le piattaforme	Amplificato	PPA	123.3/123.9	99.5	(98.1, 100)
	Non amplificato	NPA	124.9/124.9	100	(97.0, 100)
	Totale	OPA	248.2/248.8	99.8	(99.2, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi due casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Precisione da lotto a lotto con carcinoma mammario

La precisione da lotto a lotto è stata determinata testando 3 lotti di produzione di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit su strumenti BenchMark ULTRA. Ventotto casi di carcinoma mammario sono stati colorati con ciascuna sonda e kit di rilevazione. Un riepilogo dei risultati della precisione da lotto a lotto dell'analisi è riportato in Tabella 21.

Tabella 21. Precisione da lotto a lotto.

Precisione	Stato clinico	Concordanza			
		Tipo	n/N	%	CI al 95%
Da lotto a lotto	Amplificato	PPA	121/121	100	(96.9, 100)
	Non amplificato	NPA	123/123	100	(97.0, 100)
	Totale	OPA	244/244	100	(98.5, 100)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Studio di riproducibilità inter-laboratorio dello strumento BenchMark ULTRA con carcinoma mammario e adenocarcinoma gastrico

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio (ILR) per valutare la riproducibilità di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail nella determinazione dello stato del gene *HER2* in tessuti di carcinoma mammario e adenocarcinoma gastrico colorati sullo strumento BenchMark ULTRA in abbinamento a VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Sono stati usati ventotto campioni di tessuto FFPE di adenocarcinoma gastrico e mammario e circa la metà di questi casi era amplificato per lo stato dell'espressione di *HER2* e metà non era amplificato per lo stato di *HER2*.

Sono state tagliate diverse sezioni di tessuto per ciascun campione, fornite a 3 centri di studio esterni. Ciascun centro ha colorato 28 casi mammari e 28 gastrici in ciascuno di 5 giorni non consecutivi in un periodo di almeno 20 giorni. A seguito della colorazione sullo strumento BenchMark ULTRA, un patologo ha valutato ciascun vetrino per assegnare lo stato del gene *HER2*.

I risultati dello studio sono riassunti nella Tabella 22 e nella Tabella 23 seguenti. I dati sono stati analizzati per valutare PPA e NPA su tutte le osservazioni. Per ciascun caso, tutte le osservazioni valutabili (amplificato o non amplificato) sono state confrontate con il risultato modale di ciascun caso. I casi con valori del rapporto compresi tra 1.5 e 2.5 sono stati ponderati in base alla rispettiva prevalenza. Tali confronti sono stati riuniti tra centri e giorni e i risultati sono stati quindi aggregati tra i casi.

Tabella 22. ILR: tassi di concordanza sullo strumento BenchMark ULTRA per il carcinoma mammario.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza				
	Tipo	n/N	%	CI al 95%	
Tra centri (3 centri)	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)	
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	Centro A	PPA	72/74	97.3	(92.3, 100.0)
		NPA	63/63	100	(94.3, 100.0)
		OPA	135/137	98.5	(95.6, 100.0)
	Centro B	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	63/64	98.4	(95.8, 100.0)
		OPA	133/134	99.3	(97.8, 100.0)
	Centro C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	139/139	100	(97.3, 100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Tabella 23. ILR: tassi di concordanza sullo strumento BenchMark ULTRA per l'adenocarcinoma gastrico.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza				
	Tipo	n/N	%	CI al 95%	
Tra centri (3 centri)	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)	
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	Centro A	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/70	98.6	(96.0, 100.0)
		OPA	139/140	99.3	(97.9, 100.0)
	Centro B	PPA	67/67	100	(94.6, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	136/136	100	(97.3, 100.0)
	Centro C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		OPA	140/140	100	(97.3, 100.0)

Nota: gli intervalli di confidenza CI al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili; nei casi in cui la stima puntuale era pari a 100%, è stato utilizzato il metodo del punteggio di Wilson. Nello studio sono stati inclusi quattro casi con valori del rapporto ISH compresi tra 1.5 e 2.5 incluso.

Prestazioni di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS

Concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA per il carcinoma mammario

Tre laboratori di istituzioni distinte degli Stati Uniti hanno partecipato a uno studio di concordanza tra lo strumento BenchMark ULTRA PLUS e lo strumento BenchMark ULTRA. Erano disponibili 193 casi unici di carcinoma mammario invasivo FFPE a rappresentazione dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, con una distribuzione all'incirca pari tra casi con amplificazione *HER2* e senza amplificazione *HER2*. I vetrini con tessuto di tutti i casi sono stati colorati con H&E e VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail da Roche su uno strumento BenchMark ULTRA usando il protocollo di colorazione raccomandato. I vetrini con tessuto di tutti i casi non colorati sono stati randomizzati e distribuiti in pari misura (64-65 casi/per centro) sui centri dello studio per la colorazione su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS utilizzando il protocollo di colorazione consigliato per VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail. Patologi in cieco rispetto allo stato dei casi hanno valutato i vetrini colorati su un unico strumento BenchMark IHC/ISH e determinato lo stato del gene *HER2*. Trascorso un periodo di due settimane, i patologi hanno valutato i vetrini colorati sul secondo strumento BenchMark IHC/ISH. Lo stato del gene *HER2* è stato determinato utilizzando il rapporto tra i segnali del gene *HER2* e i segnali di Chromosome 17 (Chr17) (ossia il rapporto *HER2*:Chr17) nei nuclei delle cellule tumorali. Se il rapporto era 2.0 o superiore, è stato considerato *HER2* amplificato; se inferiore a 2.0, è stato considerato *HER2* non amplificato. I risultati sono stati analizzati da Roche. I tassi OPA, PPA ed NPA sono risultati pari rispettivamente a 97.1% (535/551), 97.3% (248/255) e 97.0% (287/296). I risultati sono riassunti in Tabella 24.

Tabella 24. Concordanza riunita dello stato del gene *HER2* per casi di carcinoma mammario colorati con VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail: confronto tra strumenti BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA

Stato del gene <i>HER2</i> tramite BenchMark ULTRA PLUS	Stato del gene <i>HER2</i> tramite BenchMark ULTRA		Totale
	Amplificato	Non amplificato	
Amplificato	248	9	257
Non amplificato	7	287	294
Totale	255	296	551
	n/N	% (CI al 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)	

Nota: gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili con 2000 replicati selezionati con stratificazione in base ai 4 gruppi di punteggio diagnostico utilizzati durante la selezione dei casi [amplificato (non borderline), non amplificato (non borderline), amplificato borderline, non amplificato borderline]

Strumento BenchMark ULTRA PLUS - Studio di riproducibilità inter-laboratorio con carcinoma mammario

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio (ILR) per valutare la riproducibilità di VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail nella determinazione dello stato del gene *HER2* in tessuti di carcinoma mammario colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS in abbinamento a VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Sono stati utilizzati ventotto casi unici di carcinoma mammario invasivo FFPE a rappresentazione dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, con una distribuzione all'incirca pari tra casi con amplificazione *HER2* e senza amplificazione *HER2*.

Sono state tagliate diverse sezioni di tessuto per ciascun campione, fornite a 3 centri di studio esterni. Tutti i 28 casi sono stati colorati su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS in ciascuno di 5 giorni non consecutivi in un periodo di almeno 20 giorni presso ciascun centro. I patologi hanno valutato i vetrini e determinato lo stato del gene *HER2*.

I risultati sono riassunti in Tabella 25 e in Tabella 26. I dati sono stati analizzati relativamente a PPA, NPA e OPA in Tabella 25 e APA, ANA e OPA in Tabella 26 su tutte le osservazioni. Per ciascun caso, tutte le osservazioni valutabili (amplificato o non amplificato) sono state confrontate con il risultato modale di ciascun caso. Tali confronti sono stati riuniti tra centri e giorni e i risultati sono stati quindi aggregati tra i casi.

Tabella 25. ILR: tassi di concordanza con lo stato modale sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS per il carcinoma mammario.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Complessiva	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)
Tra centri (3 centri)	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)
Tra patologi	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)

Nota: Gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili.

Tabella 26. ILR: tassi di concordanza a coppie sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS per il carcinoma mammario

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza			
	Tipo	n/N	%	CI al 95%
Tra centri (3 centri)	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)
Tra patologi	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)
Tra giorni (5 giorni non consecutivi)	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)

Nota: Gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili.

Concordanza tra strumenti BenchMark ULTRA PLUS e BenchMark ULTRA per il carcinoma gastrico

Erano disponibili 109 casi unici di carcinoma gastrico invasivo FFPE a rappresentazione dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, con una distribuzione all'incirca pari tra casi con amplificazione *HER2* e senza amplificazione *HER2*. I vetrini di tessuto sono stati colorati su uno strumento BenchMark ULTRA PLUS e su uno strumento BenchMark ULTRA utilizzando i rispettivi protocolli di colorazione consigliati. Un patologo ha assegnato il punteggio ai vetrini colorati. La concordanza percentuale complessiva per la colorazione VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail in base

allo stato del gene *HER2* (con amplificazione *HER2*, senza amplificazione *HER2*) è risultata pari a 92.4%. Gli intervalli di confidenza bilaterali al 95%, ossia da 84.4% a 96.5%, sono stati calcolati con il metodo del punteggio di Wilson. I tassi di accettabilità morfologica e del fondo per tutti i casi sono risultati pari a 100% per lo strumento BenchMark ULTRA PLUS.

Studi sulla precisione dello strumento BenchMark ULTRA PLUS per il carcinoma gastrico

Dodici casi di tessuto di carcinoma gastrico, a rappresentazione dell'intervallo di colorazione dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, sono stati sottoposti a test sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS. I casi erano distribuiti in misura all'incirca pari tra casi con amplificazione *HER2* e casi senza amplificazione *HER2* relativamente allo stato del gene *HER2*. Un patologo ha valutato i vetrini colorati. Tutti i tassi di concordanza sono stati calcolati utilizzando intervalli di confidenza bilaterali al 95% con il metodo bootstrap a percentili.

Per quanto riguarda la ripetibilità intra-corsa di colorazione, cinque vetrini per caso sono stati colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS. La concordanza percentuale complessiva per la colorazione VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail in base allo stato del gene *HER2* (con amplificazione *HER2*, senza amplificazione *HER2*) è risultata pari a 91.7% (CI al 95%: 81.7, 100.0).

Per la precisione intermedia tra giorni, due vetrini per caso sono stati colorati sullo strumento BenchMark ULTRA PLUS in cinque corse di colorazione condotte su un periodo di cinque giorni non consecutivi. La concordanza percentuale complessiva per la colorazione VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail in base allo stato del gene *HER2* (con amplificazione *HER2*, senza amplificazione *HER2*) è risultata pari a 90.8% (CI al 95%: (80.8, 100.0).

Per la precisione intermedia fra gli strumenti, due vetrini per caso sono stati colorati su ciascuno dei tre strumenti BenchMark ULTRA PLUS. La concordanza percentuale complessiva per la colorazione VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail in base allo stato del gene *HER2* (con amplificazione *HER2*, senza amplificazione *HER2*) è risultata pari a 92.6% (CI al 95%: 84.5, 100.0).

Sensibilità e specificità

La specificità analitica (efficacia dell'ibridazione) dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata colorando preparati metafasici umani normali su uno strumento BenchMark ULTRA. Dei 100 preparati metafasici analizzati, il 100% ha mostrato una co-localizzazione specifica per entrambe le sonde *HER2* e Chromosome 17.

La sensibilità analitica misura la capacità della sonda di rilevare il proprio specifico target, mentre la specificità è la capacità della sonda di distinguere il target da altre sequenze nel campione. L'analisi è dotata di un controllo di sensibilità e specificità analitiche integrato in ciascun tessuto umano. Le cellule umane normali (tra cui: fibroblasti stromali, cellule endoteliali, linfociti e cellule epiteliali mammarie non neoplastiche) dovrebbero contenere 1-2 copie di *HER2* e Chr17. Pertanto, 1-2 copie di *HER2* e Chr17 nelle cellule umane normali indicano che le sonde rilevano il proprio specifico target (una misura della sensibilità). La rilevazione di una o due copie di *HER2* e Chr17 nelle cellule normali indica inoltre che la sonda rileva soltanto i propri specifici target (una misura della specificità). Il tasso first-pass per l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su 40 campioni di tessuto mammario fissati secondo le linee guida ASCO CAP (NBF al 10% per 6-72 ore) è risultato pari al 97.5% (87.1-99.6) su strumenti BenchMark ULTRA, al 100% (91.2-100) su strumenti BenchMark XT e al 97.5% (87.1-99.6) su strumenti BenchMark GX. La specificità sui medesimi 40 campioni di mammella senza sonda di controllo era pari al 100% (91.2-100) su strumenti BenchMark ULTRA.

Il tasso first-pass per l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail su 39 campioni di tessuto gastrico fissati secondo le linee guida ASCO CAP (NBF al 10% per 6-72 ore) è risultato pari al 97.4% (86.8-99.5) su strumenti BenchMark ULTRA, al 97.4% (86.8-99.5) su strumenti BenchMark XT e al 100% (91-100) su strumenti BenchMark GX.

È stata inoltre valutata la sensibilità e specificità analitiche colorando diversi casi di tessuto normale e neoplastico umano con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit e VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. I risultati sono elencati in Tabella 27 e in Tabella 28. Non è stata osservata colorazione imprevista con l'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail sui tessuti normali e neoplastici.

Tabella 27. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata testando tessuti normali FFPE.

Tessuto	N. casi accettabili/totali	Tessuto	N. casi accettabili/totali
Ghiandola surrenale	3/3	Polmone	3/3
Vescica	3/3	Linfonodo	3/3
Midollo osseo	3/3	Mesotelio	3/3
Ovaio	3/3	Pancreas	3/3
Mammella	3/3	Ghiandola paratiroidea	3/3
Cervelletto	3/3	Nervo periferico	3/3
Cervello	3/3	Prostata	3/3
Cervice	3/3	Muscolo scheletrico	3/3
Colon	3/3	Cute	3/3
Endometrio	3/3	Milza	3/3
Esofago	3/3	Stomaco	3/3
Cuore	3/3	Testicolo	3/3
Ipfosi (ghiandola pituitaria)	3/3	Timo	3/3
Intestino	3/3	Tiroide	3/3
Rene	3/3	Lingua/ghiandola salivare	3/3
Fegato	3/3	Tonsille	3/3

Tabella 28. La sensibilità/specificità dell'analisi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail è stata determinata testando una varietà di tessuti neoplastici FFPE.

Patologia	N. casi accettabili/totali
Glioblastoma (cervello)	3/3
Meningioma (cervello)	1/1
Oligodendroglioma (cervello)	1/1
Carcinoma endometriode (ovaio)	1/1
Adenocarcinoma (ovaio)	1/1
Neoplasia neuroendocrina pancreatica (pancreas)	1/1
Adenocarcinoma (pancreas)	1/1
Seminoma (testicolo)	1/1
Carcinoma embrionale (testicolo)	1/1
Carcinoma midollare (tiroide)	1/1
Carcinoma papillare (tiroide)	1/1
Carcinoma duttale in situ (mammella)	1/1
Carcinoma duttale invasivo (mammella)	2/2
Linfoma a cellule B; NAS (milza)	1/1

Patologia	N. casi accettabili/totali
Carcinoma a piccole cellule (polmone)	1/1
Carcinoma a cellule squamose (polmone)	1/1
Adenocarcinoma (esofago)	1/1
Carcinoma a cellule squamose (esofago)	1/1
Adenocarcinoma (stomaco)	1/1
Adenocarcinoma (giunzione gastroesofagea)	1/1
Adenocarcinoma (intestino tenue)	1/1
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (intestino tenue)	1/1
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (colon)	1/1
Adenocarcinoma (colon)	1/1
Adenocarcinoma (retto)	1/1
Tumore stromale gastrointestinale (GIST) (retto)	1/1
Epatoblastoma (fegato)	1/1
Carcinoma epatocellulare (fegato)	1/1
Carcinoma a cellule chiare (rene)	1/1
Adenocarcinoma (prostata)	2/2
Leiomioma (utero)	1/1
Adenocarcinoma endometrioido (utero)	1/1
Carcinoma a cellule chiare (utero)	1/1
Carcinoma a cellule squamose (cervice)	2/2
Rabdomiosarcoma embrionale (muscolatura striata)	1/1
Carcinoma a cellule squamose (cute)	1/1
Carcinoma a cellule basali (cute)	1/1
Neurofibroma (lombare)	1/1
Neuroblastoma (retroperitoneo)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	1/1
Linfoma a cellule B; NAS (linfonodo)	2/2
Linfoma di Hodgkin (linfonodo)	3/3
Linfoma anaplastico a grandi cellule (linfonodo)	1/1
Leiomioma (vescica)	1/1
Carcinoma uroteliale (vescica)	1/1
Osteosarcoma (osso)	1/1
Mesotelioma (peritoneo)	1/1
Leiomioma (muscolatura liscia)	1/1

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Tabella 29. Soluzioni per la risoluzione dei problemi.

Problema	Soluzione
Colorazione SISH debole o assente	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi che gli erogatori dei reagenti funzionino correttamente (ossia non siano ostruiti o vuoti) e che i flaconi delle soluzioni consumabili siano pieni. Controllare la camera di caricamento dell'erogatore del reagente o il menisco per verificare l'eventuale presenza di corpi estranei o particolato, ad esempio fibre o precipitati. Se l'erogatore è bloccato, non utilizzarlo e contattare il rappresentante dell'assistenza locale. In caso contrario, caricare nuovamente l'erogatore puntandolo verso un contenitore dei rifiuti, rimuovendo il tappo dell'ugello e premendo verso il basso sulla parte superiore dell'erogatore. Se la colorazione è ancora debole o assente, passare al seguente punto 2. Assicurarsi che il tempo e il tipo di fissazione e lo spessore delle sezioni siano adeguati per le analisi basate su ISH. Assicurarsi di utilizzare montanti SISH compatibili (vedere Tabella 30) per preservare il segnale SISH. Se la colorazione è ancora debole o assente, passare al seguente punto 4. Incrementare il tempo CC1 a > 16 min. Incrementare il tempo CC2 a > 16 min per il carcinoma gastrico/GEA oppure a > 24 min per il carcinoma mammario. Incrementare il tempo ISH Protease 3 a > 16 min per il carcinoma gastrico oppure a > 20 min per il carcinoma mammario se la morfologia nucleare è intatta.
Colorazione Red ISH debole o assente	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi che gli erogatori dei reagenti funzionino correttamente (ossia non siano ostruiti o vuoti) e che i flaconi delle soluzioni consumabili siano pieni. Se la colorazione è ancora debole o assente, passare al seguente punto 2. Assicurarsi di non utilizzare bagni di alcol e lavaggi prolungati con xilene per la disidratazione dei vetrini colorati in quanto questa pratica degrada i segnali Red ISH. Se la colorazione è ancora debole o assente, passare al seguente punto 3. Assicurarsi che il tempo e il tipo di fissazione e lo spessore delle sezioni siano adeguati per le analisi basate su ISH. Incrementare il tempo CC1 a > 16 min. Incrementare il tempo CC2 a > 16 min per il carcinoma gastrico oppure a > 24 min per il carcinoma mammario. Incrementare il tempo ISH Protease 3 a > 16 min per il carcinoma gastrico oppure a > 20 min per il carcinoma mammario se la morfologia nucleare è intatta.
Fondo Red ISH aspecifico	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi di utilizzare vetrini caricati positivamente e che il campione sia fissato e tagliato adeguatamente per le analisi basate su ISH. Se il fondo Red ISH è distinguibile dallo specifico segnale Red ISH, enumerare il vetrino ma non contare i segnali Red ISH non specifici. Se il fondo Red ISH nel nucleo interferisce con l'enumerazione, ripetere la colorazione a una temperatura del lavaggio di stringenza di 76 °C o 78 °C. Anche la riduzione del tempo di trattamento con proteasi o di smascheramento dell'antigene può attenuare il fondo rosso.
Fondo SISH aspecifico	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi di utilizzare vetrini caricati positivamente e che il campione sia fissato e tagliato adeguatamente per le analisi basate su ISH. Se il fondo SISH è distinguibile dallo specifico segnale SISH, enumerare il vetrino ma non contare i segnali non specifici. Se il fondo SISH nel nucleo interferisce con l'enumerazione, ripetere la colorazione riducendo il tempo di trattamento con proteasi o di smascheramento dell'antigene.

Problema	Soluzione
Precipitazione	<ol style="list-style-type: none"> Se artefatti di precipitazione interferiscono con l'enumerazione, ripetere la colorazione. Se il fondo SISH è distinguibile dallo specifico segnale SISH, enumerare il vetrino ma non contare i segnali non specifici. Assicurarsi che le etichette dei vetrini con codice a barre siano centrate e applicate al vetrino di vetro senza che sporgano dal vetrino. Non applicare etichette doppie né riapplicare le etichette con codice a barre.
Formazione di bolle	<ol style="list-style-type: none"> Se la formazione di bolle interferisce con l'enumerazione, assicurarsi che le procedure pre-analitiche e lo spessore dei campioni siano conformi a quanto consigliato.
Dilavamento del tessuto dai vetrini.	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi di utilizzare vetrini caricati positivamente.

Montanti	Produttore	Tipo (xilene, alcol, acquoso)	Compatibilità con SISH
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xilene	Si
Ultramount	Dako	Xilene	Si

Tabella 30. Compatibilità dei montanti con le analisi basate su SISH.

Montanti	Produttore	Tipo (xilene, alcol, acquoso)	Compatibilità con SISH
Entellan	Merck	Xilene	No
Entellan New	Merck	Xilene	No
Eukitt	EMS	Xilene	No
HSR	Sysmex	Xilene	No
Malinol	Muto Chemical	Xilene	No
Acrytol	SurgiPath	Xilene	Si
Alcolmount	Diapath	Alcol	Si
BioMount 2	BBInternational	Xilene	Si
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xilene	Si
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Xilene	Si
Diamount	Diapath	Xilene	Si
DPX	BDH: Raymond Lamb	Xilene	Si
FloTexx	Lerner Labs	Xilene	Si
Gel Mount	Biomeda	Acquoso	Si
Histomount	Raymond Lamb	Xilene	Si
MicroMount	SurgiPath	Xilene	Si
MM24	SurgiPath	Xilene	Si
Mountex	Histolab	Xilene	Si
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Acquoso	Si
Paramount	Protaqs Quartett: Dako	Xilene	Si
Permout	Fisher	Xilene	Si
Pertex	Cell Path	Xilene	Si
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xilene	Si
Softmount	WAKO	Lemasol A	Si
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xilene	Si

BIBLIOGRAFIA

- Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
- Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
- Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
- Comejo KM, Kandil D, Khan A, et al. Theranostic and Molecular Classification of Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):44-56.
- Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2019.
- 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.
- Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Piccari-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.
- 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.
- 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
- 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.
- Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to Her2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2019;90(1):44-54.
- 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
- 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.
- Abrahamo-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. Her2 Testing in Gastric Cancer: An Update. *World J Gastroenterol*. 2016;22(19):4619-4625.
- 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 2000 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.

NOTA: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

Un riepilogo dei dati su sicurezza e prestazioni è disponibile qui:

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

Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1 (per gli USA: visitare il sito elabdoc.roche.com/symbols per maggiori informazioni).

GTIN Numero Prodotto Globale

Rx only Per gli USA: Attenzione: Le leggi federali consentono la vendita di questo dispositivo solo da parte di un medico o solo su prescrizione medica.

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Rev	Aggiornamenti
C	Aggiornamenti relativi alle sezioni Avvertenze e precauzioni e Bibliografia. Aggiornato all'attuale modello.

PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, PATHWAY e ULTRAVIEW sono marchi commerciali di Roche. Tutti gli altri nomi di prodotto e marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

INFORMAZIONI DI CONTATTO



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

www.roche.com



