بررسی ارزش تشخیصی IHC در مقایسه با FISH در تعیین تکثیر ژن HER2 در بلوک‌های پارافینه در سرطان پستان

دکتر سید احمد آل‌یاسین[1*]، دکتر اسماعیل اکبری[2]، فاطمه سعادتی[3]

۱. دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۲. استاد گروه جراحی عمومی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.
۳. دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۱/۰۶

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان، علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از بدخیمی در زنان در سراسر جهان به شمار می‌رود. در ۳۰-۲۰٪ سرطان‌های پستان، تکثیر یا بیان بیش از حد HER2 مشاهده می‌شود. تکثیر ژن HER2 عمدتاً توسط تکنیک‌های IHC جهت اندازه‌گیری بیان پروتئینی آن در سطح سلول و FISH جهت بررسی تکثیر ژن انجام می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت و اختصاصیت IHC در مقایسه با آزمایش FISH انجام گردید.

روش‌کار: در این مطالعه که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، ۴۴ بلوک پارافینه از بافت کارسینوم پستان متعلق به زنان مبتلا به سرطان پستان که قبلاً با تکنیک IHC بررسی شده بود، با استفاده از روش FISH برای تعیین تکثیر بیش از حد HER2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad (Anova ver8) انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: IHC در مقایسه با FISH شامل ۱۶٪ مثبت کاذب و ۹٪ منفی کاذب بود، بنابراین حساسیت IHC در شناسایی HER2+ در مثبت واقعی برابر با ۶۶/۶٪ و اختصاصیت IHC در تعیین منفی‌های واقعی برابر با ۷۸/۱٪ بود. نتایج نشان دادند که روش IHC شامل خطاهای زیادی است.

نتیجه‌گیری: سطح اطمینان نتایج مثبت و نتایج منفی به‌ترتیب برابر با ۵۳/۳٪ و ۸۶/۲٪ بود، بنابراین روش FISH باید به‌عنوان یک روش جایگزین در کنار روش IHC مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، FISH، HER2+، IHC

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** سید احمد آل‌یاسین؛ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. **تلفن:** ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۸۳؛ **پست الکترونیک:** sogand@nigeb.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در بین زنان در سراسر جهان محسوب می‌شود. سالانه میزان بروز سرطان ۲٪ افزایش یافته و بیشترین درصد مرگ‌ومیر در میان سرطان‌های مختلف را به خود اختصاص داده است (۱). علاوه بر این، برخی مطالعات نشان دادند که سن معنی‌دار بروز سرطان پستان در زنان ایرانی ۱۰ سال کمتر از زنان کشورهای غربی است و این میزان سالانه افزایش می‌یابد (۲). بر اساس گزارش‌های اخیر، در ۳۰-۲۰٪ از سرطان‌های پستان، تکثیر یا بیان بیش از حد *HER2* مشاهده شده است. *HER2* یک گیرنده تیروزین کینازی داخل غشایی را کد می‌کند که به‌وسیله پادتن تک‌گونه‌ای ضد *HER2* انسانی به نام هرسپتین[1] سرکوب می‌شود (۳، ۴). هرسپتین سیگنال‌های رشد را که توسط *HER2* به هسته انتقال داده می‌شوند را بلاک کرده و سبب افزایش پاسخ به شیمی‌درمانی می‌شود (۳). مصرف هرسپتین سبب افزایش طول عمر در بیماران سرطان پستان می‌گردد (۵)، بنابراین تشخیص تکثیر *HER2* از ارزش پیش‌آگهی خوبی در سرطان پستان برخوردار است (۶). این تکثیر ژنی سبب بیان بیش از حد *HER2* در هر دو سطح mRNA و پروتئین می‌گردد. خانواده ژنی این گیرنده شامل چهار عضو *EGFR/HER1*، *HER2*، *HER3* و *HER4* می‌شود که به‌وسیله تحریک مسیرهای سیگنالینگ فاکتورهای رشد مانند مسیر *PI3K–AKT–mTOR* عملکرد دارند. در مورد *HER2*، تصور می‌شود که فعال‌سازی به‌صورت مستقل از چنگاله رخ می‌دهد، به‌ویژه هنگامی که گیرنده *HER2* دچار جهش شده و یا بیش از حد بیان شده است. بیان بیش از حد *HER2* فعال‌سازی سازنده مسیرهای سیگنالینگ فاکتور رشد را امکان‌پذیر می‌کند و از این طریق به‌عنوان یک انکوژن در سرطان پستان عمل می‌کند (۷).

وضعیت *HER2* در سلول‌های سرطان پستان از چندین طریق مورد بررسی قرار می‌گیرد؛ از جمله برای تکثیر ژن پروتوآنکوژن *HER2* در هسته سلول با روش FISH[2]، بیان بیش از حد پروتئین *HER2* در سطح سلول با روش ایمنوهیستوشیمی (IHC)[3]، رونویسی معکوس و نورترن بلات برای بیان بیش از حد RNA قابل تشخیص از ژن *HER2* است.

FISH و IHC دو آزمایش مورد استفاده برای تشخیص تکثیر *HER2* در سطح ژنومی و بیان بیش از حد پروتئین آن در سطح سلول هستند (۸). تشخیص وضعیت *HER2* به‌طور مرتب توسط تست‌های FISH و IHC که اغلب در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده می‌شود، صورت می‌گیرد (۹). از FISH به‌عنوان استاندارد طلایی فعلی تشخیص *HER2* با دقت بالا استفاده می‌شود. با این‌حال چندین معایب در مورد این روش مطرح شده است. FISH یک تکنیک پرزحمت، وقت‌گیر و گران است که نیاز به آموزش تخصصی برای انجام موفقیت‌آمیز دارد. از این رو، IHC به‌عنوان یک آزمایش جایگزین به‌طور معمول، در سراسر جهان استفاده می‌شود (۱۰). محبوبیت IHC عمدتاً به‌دلیل ارزان بودن و راحتی در کار است. با این حال، تغییر در حساسیت و میزان اختصاصیت برای آنتی‌بادی‌های مختلف تجاری گزارش شده است. علاوه بر این، شیوع یکنواخت وضعیت *HER2* در بین جمعیت‌های مختلف به‌دست نیامده است (۱۱). با توجه به افزایش میزان شیوع سرطان پستان در کشور، تعیین قابلیت اطمینان آزمایش IHC از طریق ارزیابی حساسیت و اختصاصیت مورد نیاز است؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف تشخیص تکثیر *HER2* از طریق روش FISH مجموعه‌ای از تومورهای سرطان پستان و مقایسه نتایج با نتایج IHC از همان تومورها انجام شد.

روش‌کار

بلوک‌های پارافینه بیمار سرطان پستان

در این مطالعه آزمایشگاهی مشاهده‌ای که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، در مجموع ۴۴ بافت بلوک‌های پارافینه متعلق به زنان مبتلا به کارسینوم پستان در سنین

[1] Herceptin

[2] Fluorescent in situ hybridization

[3] Immunohistochemistry

مختلف، توسط مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شد. تشخیص سرطان پستان در آزمایشگاه تشخیصی تأیید شد.

هیبریداسیون فلوئورسانس درجا (FISH)

از تست FISH به‌عنوان آزمایش گلد استاندارد جهت تشخیص ازدیاد ژن HER2 استفاده می‌گردد. برش‌هایی با ضخامت ۴ میکرومتر با استفاده از دستگاه میکروتوم از بلوک‌های بافتی پارافینه تهیه شدند. سپس این برش‌ها به اسلایدهای شیشه‌ای که توسط پلی L- لیزین شارژ شده بودند، منتقل شدند. پس از روش خارج کردن پارافین، اسلایدها هیدراته شدند. به‌منظور از بین بردن پروتئین‌های اضافی، اسلایدها توسط پپسین تیمار شدند. سپس آب اسلایدها با استفاده از رهیدراتاسیون خشک شدند. پس از یک شب هیبریداسیون پروب‌های فلورسنت، اسلایدها شسته شدند. سلول‌های تومور توسط میکروسکوپ‌های فلورسنت مشاهده شد.

هر دو سیگنال *HER2* و CEN17 حداقل در ۲۰ هسته تصادفی در هر بافت شمارش شدند. نسبت *HER2*/CEN17 برای تفسیر سیگنال‌ها در نظر گرفته شد. تومورهای با نسبت بیش از ۲/۲ به‌عنوان FISH مثبت (FISH+) یا تکثیر شده *HER2* و کمتر از ۱/۸ به‌عنوان FISH منفی (FISH-) یا *HER2* بدون استفاده تعبیر شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad (Anova ver8) انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه نتایج IHC و FISH

نمونه‌های با نتایج IHC برای +۱، +۲ و +۳ به‌ترتیب به‌عنوان منفی عدد بین ۰ تا +۱، نامشخص (UC) مثبت ضعیف با سیگنال ضعیف غشایی عدد +۲ و مثبت با سیگنال قوی غشایی عدد +۳ برای تکثیر پروتئین *HER2* در نظر گرفته شدند. البته باید در نظر گرفت که در آزمایش IHC متغیر بودن روش کار، آنتی‌بادی انتخاب شده، فقدان روش استاندارد برای تفسیر نتایج و متفاوت بودن نتایج تفسیر بین کارشناسان، تأثیر نامطلوبی بر ارزش نتیجه این تست در تعیین ازدیاد بیان Her2 می‌گذارد. از کل ۴۴ نمونه، نتایج IHC برای +۱، +۲ و +۳ به‌ترتیب، ۲۴ (۵۵٪)، ۵ (۱۱٪) و ۱۵ (۳۴٪) بودند، در حالی که این نتایج برای آزمون FISH، ۱۲ (۲۷٪) مثبت و ۳۲ (۶۳٪) منفی بودند. پس از مقایسه با نتایج FISH، ۶ عدد مختلف به‌دست آمد، اول مثبت واقعی (TP)، IHC مثبت و FISH مثبت ۸ مورد، دوم مثبت کاذب (FP)، IHC مثبت و FISH منفی ۷ مورد، سوم منفی کاذب (FN)، IHC منفی و FISH مثبت ۲ مورد، چهارم منفی واقعی (TN)، IHC منفی و FISH منفی ۲۲ مورد، پنجم و ششم IHC نامشخص FISH مثبت UCP=۲ و FISH منفی UCN=۳ تقسیم شدند. جواب IHC در ۱۵ نمونه مثبت و در ۲۴ نمونه منفی بودند.

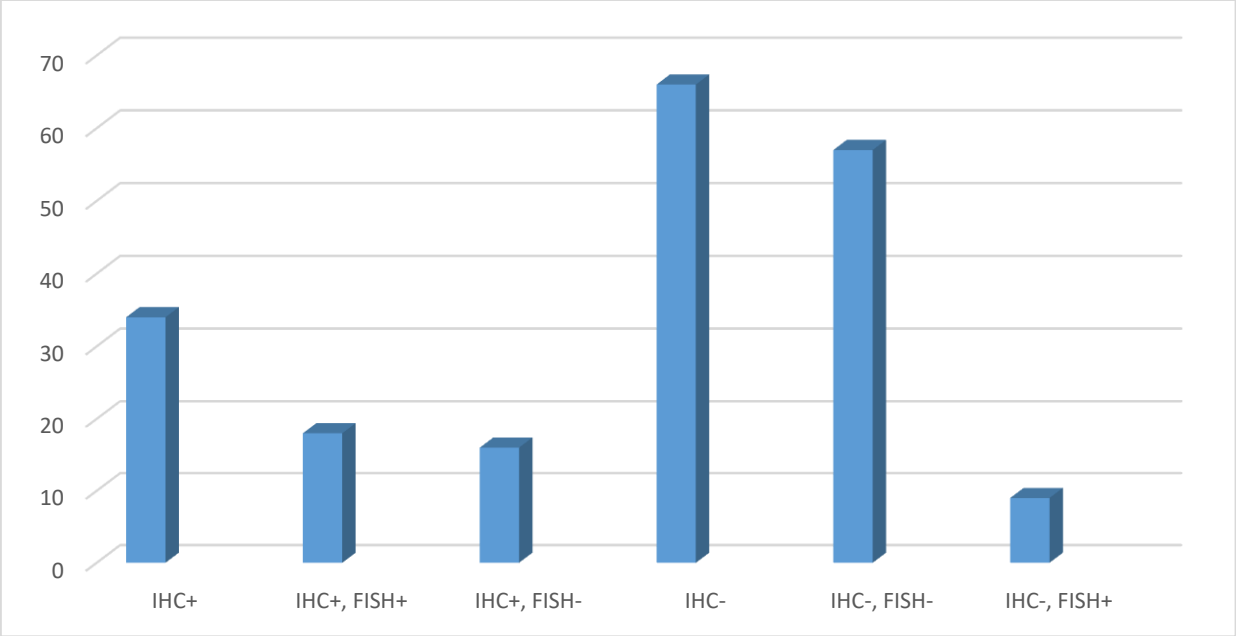
مثبت کاذب و منفی کاذب IHC بر اساس نتایج FISH محاسبه شد. از ۱۵ مورد IHC^{+3} مثبت، ۷ نفر (۴۶٪) مثبت کاذب و ۸ نفر (۵۴٪) مثبت واقعی بودند. از ۲۴ نفر IHC^{+1} منفی، ۲ نفر (۸/۳٪) منفی کاذب و ۲۲ (۹۱/۷٪) منفی واقعی بودند. هنگامی که ۵ مورد مشکوک معادل IHC^{+2} مورد بررسی قرار گرفت، ۲ مورد (۴۰٪) FISH مثبت و ۳ مورد (۶۰٪) FISH منفی بودند.

نتایج IHC در مقایسه با FISH، دارای ۷ مثبت کاذب و ۴ منفی کاذب بودند. از ۱۲ FISH مثبت، ۸ مورد IHC+ و ۴ مورد IHC- برابر با (۶۶٪) TP و (۳۴٪) FP بودند. از ۳۲ FISH منفی (۷۸٪)، ۲۵ مورد IHC- و ۷ مورد (۲۲٪) IHC+ بودند. بر اساس نتایج FISH، حساسیت و اختصاصیت IHC ۸۰٪ برای موارد IHC+ و ۷۶٪ برای موارد IHC- شناخته شده است.

حساسیت و اختصاصیت IHC در مقایسه با FISH

حساسیت تست IHC به‌معنای احتمال TP IHC3+ است؛ یعنی در این حالت FISH هم مثبت است و به‌معنای تکثیر *HER2* (میزان TP) (۸۰٪=۲+۸/۸) است. در صورتی‌که اختصاصیت تست IHC زمانی است که IHC منفی واقعی باشد و نتیجه آزمایش FISH هم منفی است (میزان TN) (۷۵/۸۶٪=۲۲+۲۲/۷). ارزش پیش‌بینی مثبت، TP است زمانی که آزمون IHC مثبت باشد (۵۳/۳۳٪=۸+۸/۷). مقدار پیش‌بینی منفی،

TN است زمانی که آزمون IHC منفی باشد (۹۱/۶۷٪=۲+۲۲/۲۲) (جدول ۱). دقت یا کارایی آزمون IHC، برابر درصد نتایج آزمون است که به‌درستی توسط آزمون IHC مشخص شده است (TP+TN+FP+FN) / (TP+TN). شیوع *HER2+* به‌معنای موارد *HER2+* در بین سرطان‌های پستان آزمایش شده است (TP+TN+FP+FN+UC)/ (TP8+FN2+UCP2)، (۲۵/۶٪=۲+۲/۴۴+۸). میزان حساسیت آزمایش IHC در مقایسه با آزمایش FISH برابر ۸۰٪ می‌باشد و میزان اختصاصیت IHC در مقایسه با آزمایش FISH برابر ۷۶٪ می‌باشد (جدول ۲).



شکل ۱ – مقایسه نتایج کل +IHC و -IHC و تأییدیه آنها با آزمایش FISH. از ۴۴ نمونه، چپ به راست: ۳۴٪ +IHC، ۱۸٪ +FISH +IHC، ۱۶٪ +IHC -FISH، ۶۶٪ -IHC، ۵۷٪ -IHC -FISH و ۹٪ +IHC -FISH

این شکل نشان می‌دهد که در ۹٪ موارد آزمایش +FISH بوده، در صورتی‌که جواب‌های آزمایش -IHC شده است و نشان‌دهنده نتایج منفی کاذب و در ۱۶٪ موارد نیز آزمایش -FISH و +IHC شده است که نشان‌دهنده نتایج مثبت کاذب آزمایش IHC می‌باشد.

جدول ۱- مقایسه نتایج IHC و FISH

HER2	total	$FISH^+$	$FISH^-$	سطح معنی‌داری
IHC^{+1}	۲۴ (۵۴/۵)	۲ (۸/۳)	۲۲ (۹۱/۷)	<۰/۰۵
IHC^{+2}	۵ (۱۱/۵)	۲ (۴۰)	۳ (۶۰)	
IHC^{+3}	۱۵ (۳۴)	۸ (۵۴)	۷ (۴۶)	
Total	۴۴ (۱۰۰)	۱۲ (۲۷)	۳۲ (۷۳)	

همانطور که در جدول مشاهده می‌گردد در بیشتر موارد IHC^{+2} (۶۰٪)، آزمایش FISH مثبت شده است. همچنین در مورد IHC^{+1} تنها در ۲ مورد FISH مثبت شده، بنابراین منفی کاذب تنها در ۸/۳٪ موارد رخ داده، در صورتی‌که مثبت کاذب در ۴۶٪ مواقع در IHC^{+3} رخ داده است و نشان‌دهنده احتمال خطای بیشتر در این حالت می‌باشد.

جدول ۲- حساسیت، اختصاصیت و ارزش پیش‌بینی مثبت/ منفی IHC بر اساس نتیجه FISH (IHC/FISH)

آمار	فرمول	ارزش	CI ٪۹۵
حساسیت	۱۰۰*(TP/TP+FN)	٪۸۰/۰۰	٪۴۴/۳۹-۹۷/۴۸
اختصاصیت	۱۰۰*(TN/FP+TN)	٪۷۵/۸۶	٪۵۶/۴۶-۸۹/۷۰
ارزش پیش‌آگهی مثبت	۱۰۰*(TP/TP+FP)	٪۵۳/۳۳(*)	٪۳۵/۸۴-۷۰/۰۴٪
ارزش پیش‌آگهی منفی	۱۰۰*(TN/FN+TN)	٪۹۱/۶۷(*)	٪۷۵/۷۹-۹۷/۴۸

میزان حساسیت آزمایش IHC در مقابل آزمایش FISH برابر ۸۰٪ و میزان اختصاصیت IHC در مقابل آزمایش FISH برابر ۷۶٪ بود.

بحث

در مطالعه حاضر که با هدف مقایسه نتایج تکثیر ژنی پروتوآنکوژن FISH و ازدیاد بیان پروتئینی IHC در ارزیابی تکثیر *HER2* در تومورهای سرطان پستان انجام شد، مقایسه نتایج IHC و FISH نشان داد که ۴۶٪ از IHC^{+3} مثبت کاذب و ۸/۳٪ از IHC^{+1} منفی کاذب بودند. این نشان می‌دهد که IHC^{+3} مثبت کاذب تقریباً ۶ برابر بیشتر از IHC^{+1} منفی کاذب اتفاق می‌افتد. علاوه بر این، هنگامی که نرخ خطا در IHC^{+2} مشکوک مورد بررسی قرار گرفت، ۴۰٪ (۲/۵) مثبت و ۶۰٪ (۳/۵) منفی بود. هرچه میزان آنتی‌بادی *HER2* افزایش می‌یابد، میزان مثبت کاذب افزایش می‌یابد. این امر با این واقعیت توضیح داده می‌شود که با افزایش بیان *HER2*، احتمال هیبریداسیون غیراختصاصی آنتی‌بادی-ها با پروتئین‌های ساختاری مشابه با *HER2* افزایش می‌یابد. یکی دیگر از دلایل احتمالی این است که شدت لکه‌های IHC افزوده می‌شود که ممکن است به‌دلیل اتصالات خطای آزمایشگاهی اتفاق می‌افتد.

در مطالعه حاضر، حساسیت و اختصاصیت IHC به‌ترتیب ۸۰٪ و ۷۶٪ گزارش شد. مطالعه بانکفالوی و همکاران (۲۰۰۰) از حساسیت ۸۰٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ با استفاده از آنتی‌بادی Novacastra CB11 برای تشخیص پروتئین *HER2* خبر داد. سایر مطالعات قبلی برای حساسیت در جمعیت‌های مختلف، دامنه ۶٪ تا ۸۰٪ را به‌دست آوردند (۱۵-۱۲). این دامنه بالای تنوع بین وضعیت *HER2* IHC عمدتاً به‌دلیل استفاده از آنتی‌بادی‌ها با درجه حساسیت متفاوت است (۱۶). در میان آنتی‌بادی‌های ضد *HER2*، Dako A0485، Novacastra CB11، Zymed Tab250 و Dako Herceptest رایج‌ترین انواع تجاری هستند که در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای تعیین وضعیت *HER2* مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۷). در میان آنها ثابت شده است که TAB250 بیشترین حساسیت را دارد.

در مطالعه حاضر ۴۶٪ از IHC^{+3} مثبت کاذب و ۸/۳٪ از IHC^{+1}، منفی کاذب بودند. انتظار می‌رفت که همه IHC^{+3}، $FISH^{+}$ باشد و همه IHC^{+1} کاملاً با FISH مطابقت داشته باشند. با این حال، برخی پارامترها باعث اختلاف بین FISH و IHC می‌شوند. در روش IHC متغیر بودن روش‌کار، آنتی‌بادی انتخاب شده، فقدان روش استاندارد برای تفسیر نتایج و متفاوت بودن نتایج تفسیر بین کارشناسان، تأثیرات ناهمگنی بر ارزش نتیجه این تست در تعیین ازدیاد بیان Her2 می‌گذارد. همچنین برخی مشکلات عمده در مرحله تثبیت بافت رخ می‌دهد. دوره زمانی بین استخراج بافت و تثبیت، مدت زمان تثبیت و ضخامت برش‌های از نمونه پارافینه تا حد زیادی می‌تواند بر نتایج IHC در مراحل بعدی تأثیر بگذارد (۱۸). بهترین زمان برای تثبیت ۴۸-۶ ساعت پس از استخراج است (۱۹). تثبیت بیش از حد بافت در فرمالین باعث افزایش ساختار سلول و چگالی کروماتین می‌شود، بنابراین در نفوذ پروب و هیبریداسیون به DNA دخالت می‌کند و منجر به نتایج FISH منفی کاذب می‌شود (۲۰، ۲۱). علاوه بر این، در ۱۵-۳٪ موارد بیان بیش از حد پروتئین رخ می‌دهد، در حالی که *HER2* در سطح DNA تکثیر نمی‌شود، در حالی که بخشی از آنها *HER2* مثبت در سطح DNA بدون بیان بیش از حد در سطح پروتئین هستند، بنابراین یک زیرگروه از موارد مثبت *HER2* از طریق آزمایش FISH از دست می‌رود (۲۲) که این نتایج

می‌تواند تأثیر منفی در پیش‌آگهی و پیش‌بینی نتیجه درمان به داروی هرسپتین ایجاد نماید. این خطاها حاکی از آن است که هر دو FISH و IHC مستعد نتایج کاذب هستند، بنابراین باید به‌عنوان تست‌های مکمل اعمال شوند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه میزان حساسیت و اختصاصیت IHC در مقایسه با آزمایش FISH به‌ترتیب ۸۰٪ و ۷۶٪ گزارش شد. برتری آزمایش FISH نسبت به IHC در این است که FISH حساس‌تر و اختصاصی‌تر در تعیین وجود HER^{-2}در سطح DNA سلول می‌باشد و به‌صورت کمّی است و هم‌خوانی نتایج آزمایش‌های آن نسبت به IHC بیشتر است. در نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که از IHC باید به‌عنوان اولین قدم برای غربالگری بافت‌های سرطان پستان برای وضعیت تکثیر *HER2* استفاده شود، با این حال، یک آزمایش FISH، به‌عنوان یک آزمایش مکمل به‌شدت توصیه می‌شود تا در آن نمونه-هایی با نتایج IHC مثبت ضعیف اعمال شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط یک پروژه از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری تهران پشتیبانی شد. بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به‌علت تهیه نمونه‌ها و از تمام شرکت‌کنندگان در این مطالعه به‌خاطر همکاری آنها تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Lei S, Zheng R, Zhang S, Wang S, Chen R, Sun K, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. Cancer Communications 2021; 41(11):1183-94.
2. Alizadeh M, Ghojazadeh M, Piri R, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mohammadi S, Naghavi-Behzad M. Age at Diagnosis of Breast Cancer in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. Iran J Public Health 2021; 50(8):1564-76.
3. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma. Cancers 2021; 13(14):3540.
4. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. InSeminars in cancer biology 2021; 72:123-35.
5. Ali S, Hendry J, Le D, Mondal PK, Sami A, Chalchal H, et al. Efficacy of adjuvant trastuzumab in women with HER2-positive T1a or bN0M0 breast cancer: a population-based cohort study. Scientific Reports 2022; 12(1):1-8.
6. Thorat MA, Levey PM, Jones JL, Pinder SE, Bundred NJ, Fentiman IS, et al. Prognostic and predictive value of HER2 expression in ductal carcinoma in situ: Results from the UK/ANZ DCIS Randomized Trial. Clinical Cancer Research 2021; 27(19):5317-24.
7. El-Gamal MI, Mewafi NH, Abdelmotteleb NE, Emara MA, Tarazi H, Sbenati RM, et al. A review of HER4 (ErbB4) kinase, its impact on cancer, and its inhibitors. Molecules 2021; 26(23):7376.
8. Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, Diorio C. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. American journal of clinical pathology 2015; 144(5):686-703.
9. Ahn S, Woo JW, Lee K, Park SY. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. Journal of pathology and translational medicine 2020; 54(1):34-44.
10. Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Livanos G, Zervakis M, Pitas I, Lyroudia K. Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review. Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology 2007; 71(7):439-50.
11. Gremel G, Grannas K, Sutton LA, Pontén F, Zieba A. In situ protein detection for companion diagnostics. Frontiers in Oncology 2013; 3:271.
12. Chao WR, Lee MY, Ruan A, Sheng HP, Hsu JD, Han CP, et al. Assessment of HER2 status using immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques in mucinous epithelial ovarian cancer: a comprehensive comparison between ToGA biopsy method and ToGA surgical specimen method. PloS one 2015; 10(11):e0142135.
13. Kobayashi M, Ooi A, Oda Y, Nakanishi I. Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in breast carcinomas: a comparative study of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Human pathology 2002; 33(1):21-8.

14. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Journal of Clinical Oncology 2001; 19(2):354-63.
15. Bankfalvi A, Simon R, Brandt B, Bürger H, Vollmer I, Dockhorn-Dworniczak B, et al. Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. Histopathology 2000; 37(5):411-9.
16. Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Di Leo A, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas: correlation with oncogene amplification in 160 cases. American journal of clinical pathology 2000; 113(5):675-82.
17. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. Modern Pathology 2001; 14(11):1079-86.
18. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland 2001; 195(4):422-8.
19. Garbar C, Savoye AM, Mascaux C, Brabencova E, Curé H. The human epidermal growth factor receptor 2 screening tests for breast cancer suggested by the new updated recommendation of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists will involve a rise of the in-situ hybridization tests for the European laboratories of pathology. International Scholarly Research Notices 2014; 2014.
20. Hwang HC, Gown AM. Evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene status in human breast cancer formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens by fluorescence in situ hybridization (FISH). In: Cao J. (eds) Breast Cancer. Methods in Molecular Biology 2016; 1406:61-70. Humana Press, New York, NY.
21. Press OA, Guzman R, Cervantes M, Santiago A, Press MF. Characterization of HER2 status by fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC). In: Day C. (eds) Histopathology. Methods in Molecular Biology 2014; 1180: 181-207. Humana Press, New York, NY.
22. Makroo RN, Chowdhry M, Kumar M, Srivastava P, Tyagi R, Bhadauria P, et al. Correlation between HER2 gene amplification and protein overexpression through fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in breast carcinoma patients. Indian Journal of Pathology and Microbiology 2012; 55(4):481.