

Etapa 1

Optimizarea protocolului FICTION

noiembrie – decembrie 2020

Rezumatul Etapei 1

Obiectivul acestei etape a fost investigația tehnicii FICTION (imunofenotiparea fluorescenței și citogenetica interfazică ca instrument al investigației neoplasmelor) pentru evaluarea statusului HER2 în carcinoamele invazive ale sânului prin compararea cu standardul actual (testarea secvențială HER2 prin imunohistochimie (IHC) și hibridizare in situ (ISH)).

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv am desfășurat următoarele activități cuprinse în Planul de Lucru pentru Etapa 1:

Activitatea 1.1. Selectarea a 50 de carcinoame invazive de sân (primare sau metastatice) din dosarele de la Departamentul de patologie al IOCN, cu date clinice disponibile, statusul receptorilor hormonal, a Ki-67 și evaluarea HER2 prin IHC și ISH.

Activitatea 1.2. Optimizarea protocolului FICTION: evaluarea parametrilor protocolului pentru diferite tipuri de probe de țesut (în funcție de locul anatomic din care a fost efectuată biopsia).

Livrabilele prevăzute pentru această etapă:

- Protocolul FICTION optimizat

Rezultate obținute

Activitatea 1.1.

Selecția cazurilor s-a realizat din cazuistica Departamentului de Anatomie Patologică al IOCN. Cazurile selectate au fost diagnosticate în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică, cu carcinoame mamare invazive.

Pacienți și metode:

Criteriile de includere:

- Pacienți diagnosticați cu carcinoame invazive ale glandei mamare
- Examinarea histopatologică realizată în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Statusul receptorilor estrogenici, progesteronici, HER2 și valoarea Ki-67 cunoscută și evaluată în cadrul în Laboratorul de Anatomie Patologică al IOCN
- Cazuri care au fost evaluate prin IHC și prin metoda FISH pentru evaluarea expresiei proteinei HER2 și pentru evaluarea statusului genei HER2

Examinarea microscopică:

Examinarea histopatologică a cazurilor pentru stabilirea diagnosticului a fost realizată conform protocolului diagnostic a departamentului. Evaluarea histopatologică a urmat recomandările OMS 2019 din *WHO classification of tumors of the breast, 2019, ediția a 5-a*.

Tipul histologic de carcinom invaziv a fost clasificat conform OMS 2019. Gradarea cazurilor s-a realizat folosind sistemul de gradare Nottingham.

Evaluarea expresiei receptorilor estrogenici(RE) și progesteronici(RP), Ki-67 și HER2 s-a realizat conform recomandărilor ASCO/CAP actuale.

Etapa pre analitică a cazurilor a fost în realizată în conformitate cu ghidurile ASCO/CAP în vigoare pentru prelevarea și procesarea specimenelor provenite de la paciente cu carcinoame mamare.

Colorațiile imunohistochimice (IHC) pentru RE,RP și KI-67 s-au realizat în conformitate cu protocolul de colorare IHC manuală validat al laboratorului. Colorațiile IHC pentru HER2 s-au realizat folosind tehnica de IHC automată și automatul de colorare Ventana Benchmark Ultra.

Pentru lamele colorate pentru RE și RP s-au utilizat ca martor intern expresia acestor markeri la nivelul parenchimului mamar glandular netumoral. În cazul evaluării unui material care nu conține aceste structuri absența controlului intern se menționează în rezultatul histopatologic. Colorațiile IHC pentru evaluarea expresiei HER2 au fost realizate folosind pe fiecare lamă un control extern reprezentat de un fragment tisular care conține o proliferare tumorală de tipul unui carcinom invaziv cu scor IHC 3+(pozitiv).

Lotul de pacienți:

Lotul de studiu a fost reprezentat de 49 de pacienți cu carcinom mamar invaziv, respectiv 51 de specimene distincte prelevate, cu vârstă cuprinsă între 32 și 80 de ani, cu o medie de vârstă de 57.625 ani și o mediană de 60 de ani. Distribuția vârstei pacienților este detaliată în figura 1.1.

Din punct de vedere al distribuției pe sexe 97,95 % din subiecți au fost de sex. Două din aceste cazuri au prezentat carcinoame mamare bifocale și un caz a prezentat carcinoame mamare bilaterale. Astfel în final au fost examinate 51 de formațiuni tumorale provenite de la acești pacienți.

Din punct de vedere al localizării formațiunii tumorale peste 92% din specimene au fost recoltate de la nivelul parenchimului mamar (figura 1.2).

Din punct de vedere al tipului de material examinat 68,62% din secțiunile examinate au fost reprezentate de specimene biopsice, iar restul au fost specimene de excizie (figura 1.3).

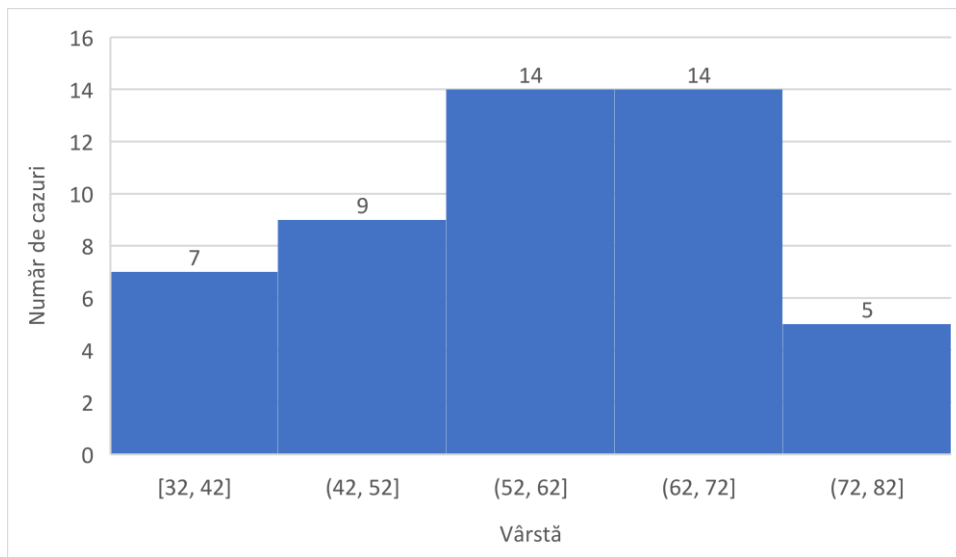


Figura 1.1. Distribuția vârstei pacienților

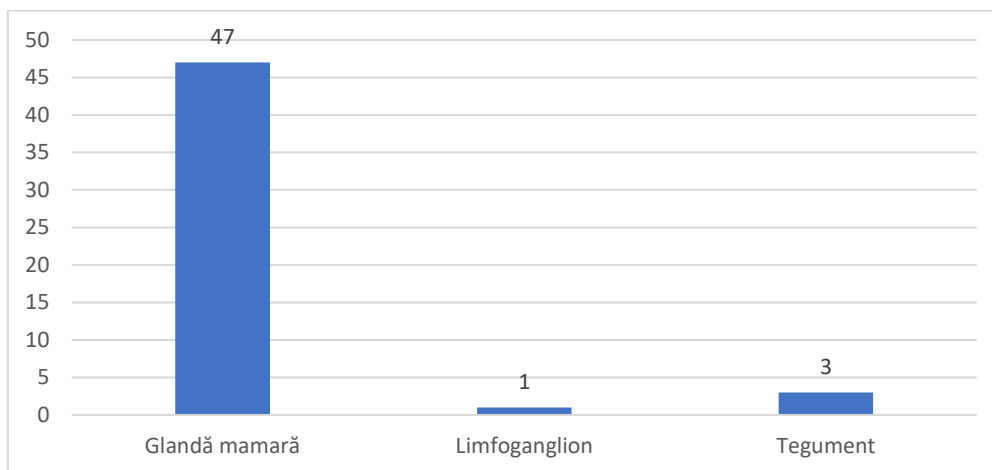


Figura 1.2. Localizarea anatomică a proliferării tumorale

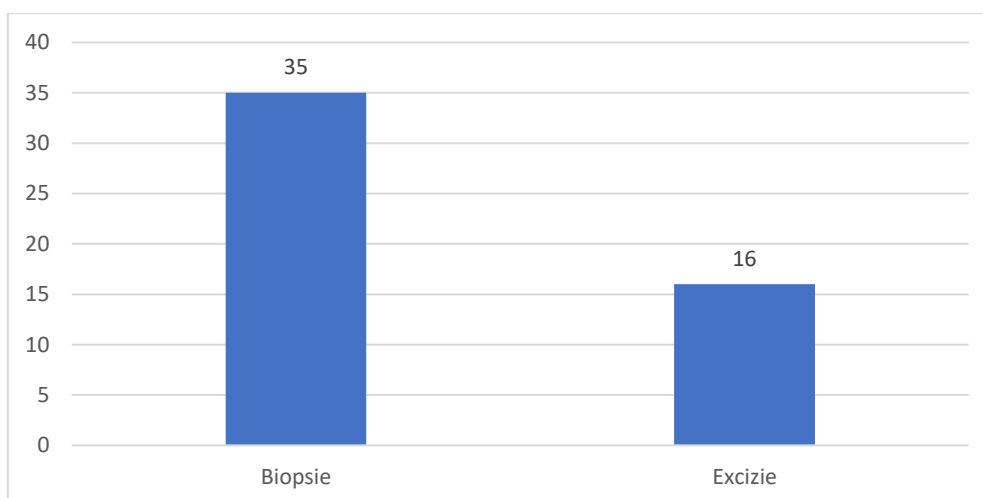


Figura 1.3. Tipul de material tisular examinat

Din punct de vedere al tipului histologic majoritatea cazurilor au fost reprezentate de carcinoame mamare invazive NST/ductal invazive ("No special type"), urmate de carcinoamele lobulare (figura 1.4). Din cele 6 cazuri de carcinoame lobulare invazive 2 au fost reprezentate de carcinoame lobulare invazive pleomorfe. Din categoria de carcinoame invazive mixte un caz a fost reprezentat de NST + mucinos, mucinos+NST+cribriform+micropapilar, un caz de carcinom invaziv NST+cribriform și un caz de carcinom invaziv NST+lobular invaziv. Pentru un caz nu s-a realizat încadrarea într-un subtip histologic.

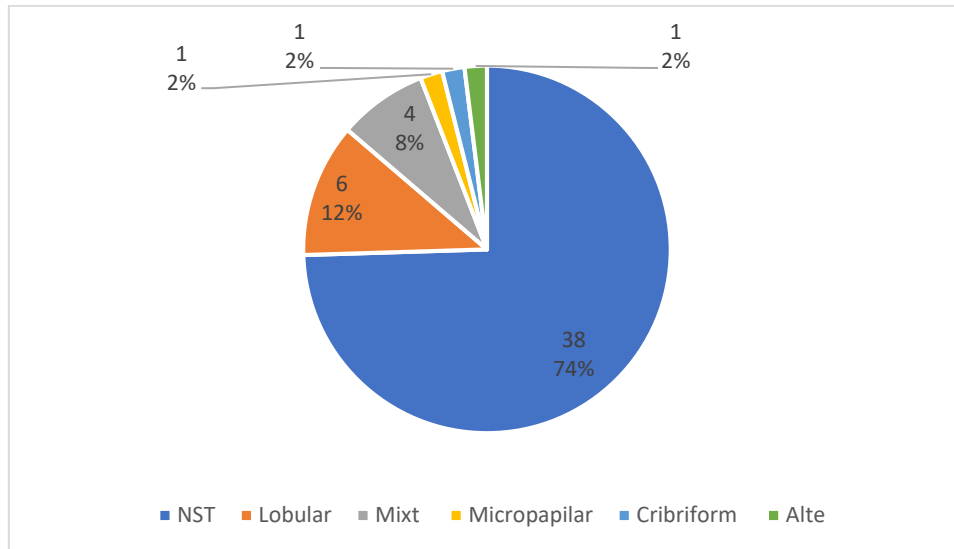


Figura 1.4. Distribuția tipurilor histologice în lotul examinat

Distribuția lotului în funcție de gradul Nottingham este detaliată în figura 5. Pentru două cazuri gradarea nu a fost realizată. Majoritatea cazurilor (68%) au fost reprezentate de carcinoame de grad înalt (grad Nottingham 2 sau 3)(figura 1.5).

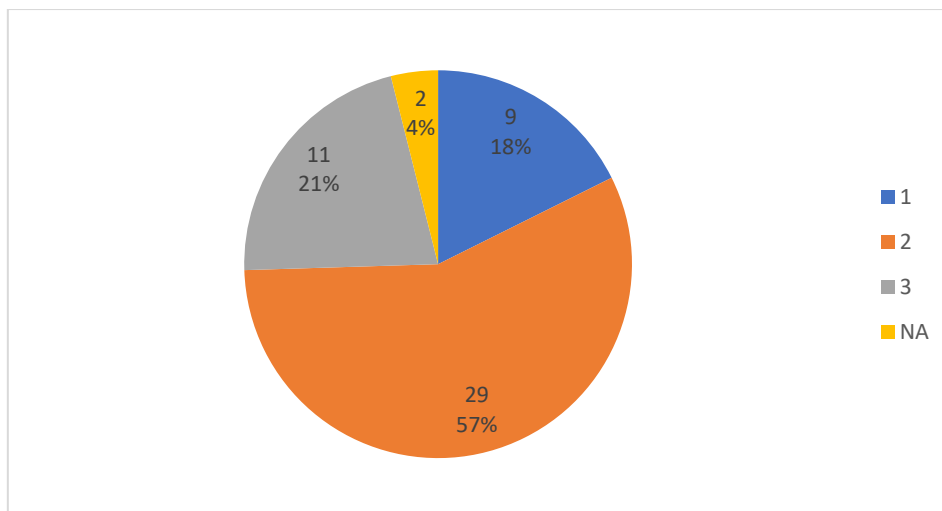


Figura 1.5. Distribuția lotului în funcție de gradul Nottingham

Din punct de vedere imunohistochimic expresia RE si RP este prezentată în tabelul 1.1. Patru cazuri examinate au fost negative pentru RE si RP având un scor Allred 0. Noua cazuri nu au exprimat RP.

Scor Allred Estrogen	Număr de cazuri	Scor Allred Progesteron	Număr de cazuri
0	4	0	9
4	1	3	1
7	9	4	4
8	37	5	6
		6	5
		7	5
		8	21

Tabel 1.1. Distribuția scorului Allred pentru RE și RP

Din punct de vedere al expresiei proteinei HER2 majoritatea cazurilor evaluate au avut un scor IHC 2+(echivoc)(figura 1.6). De asemenea, au fost incluse în lotul studiat și cazuri de 1+(negativ) și 3+(pozitiv).

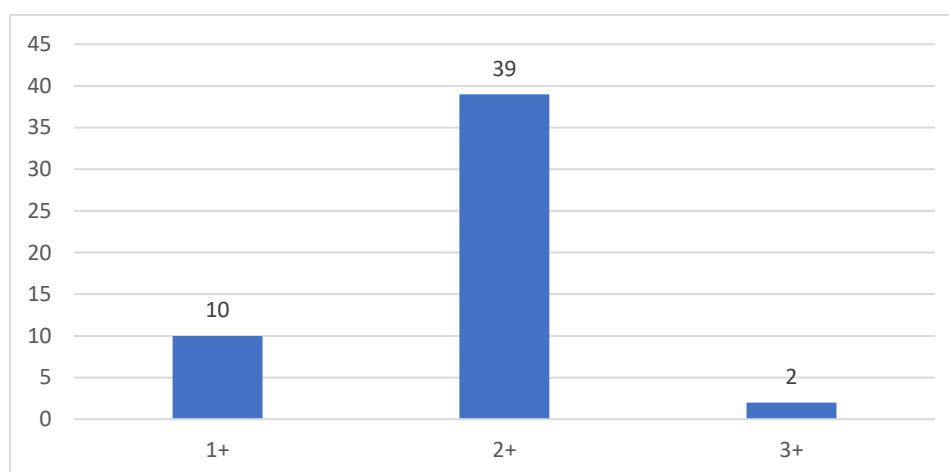


Figura 1.6. Expresia IHC a HER2 în lotul studiat

Toate cazurile studiate au fost evaluate concomitent și prin tehnica de hibridizare in situ cu fluorescență (FISH). Evaluarea cazurilor s-a realizat conform recomandărilor ASCO/CAP 2018. În figura 1.7 este sumarizată încadrarea cazurilor în grupele HER2 ASCO/CAP.

În conformitate cu recomandările ASCO/CAP 2018 evaluarea statusului final al HER2 pentru fiecare caz în parte se realizează după evaluarea concomitentă a scorului IHC și a rezultatelor hibridizării in situ. Astfel, pentru grupele ASCO/CAP 2, 3 și 4 se recomandă evaluarea în paralel a rezultatelor IHC si FISH. Încadrarea finală a cazurilor este prezentată în Figura 1.8.

Distribuția Ki-67 în lotul examinat este prezentată în figura 1.9. Valoarea ki-67 a fost evaluate pentru 48 din tumorile incluse în studiu. Valoarea Ki-67 a variat între 5% și 65% cu o medie de 26% și cu o mediană de 21%.

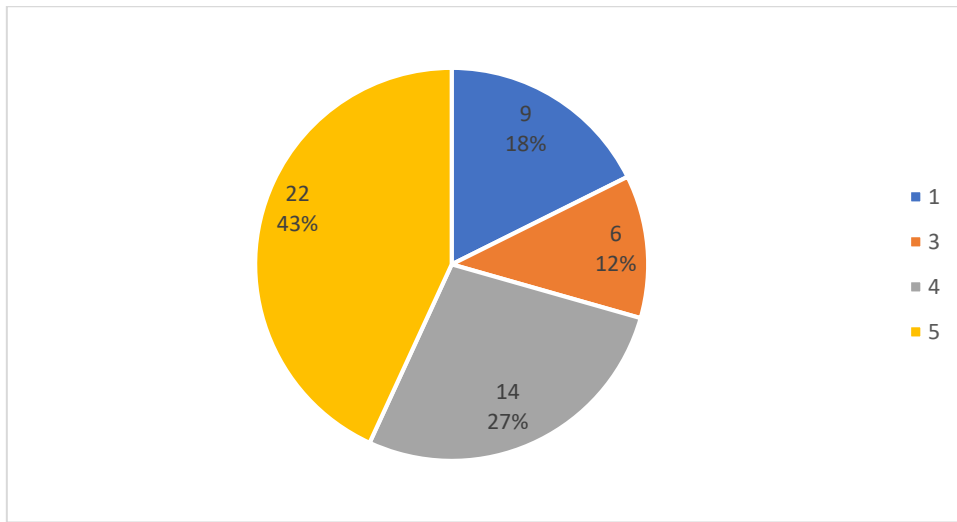


Figura 1.7. Încadrarea cazurilor în Grupurile ASCO/CAP HER2 pentru hibridizarea in situ.

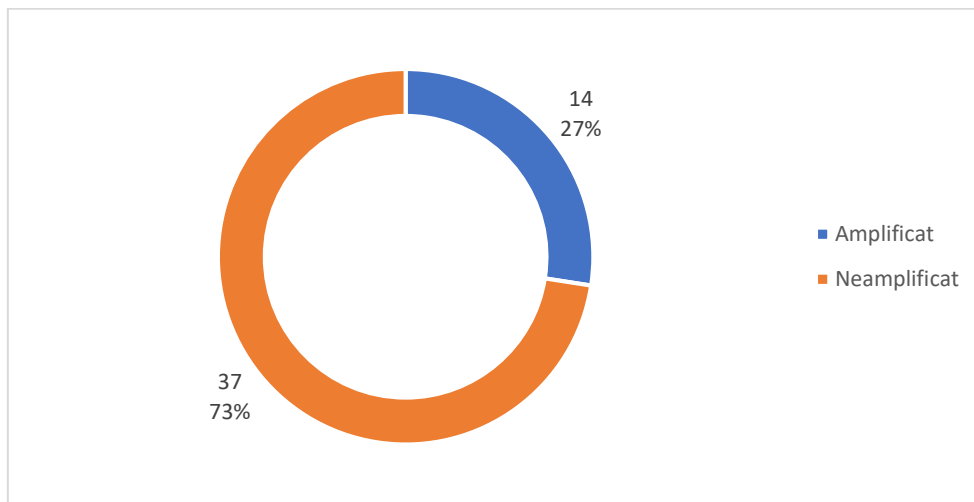


Figura 1.8. Distribuția cazului în funcție de rezultatele testării HER2.

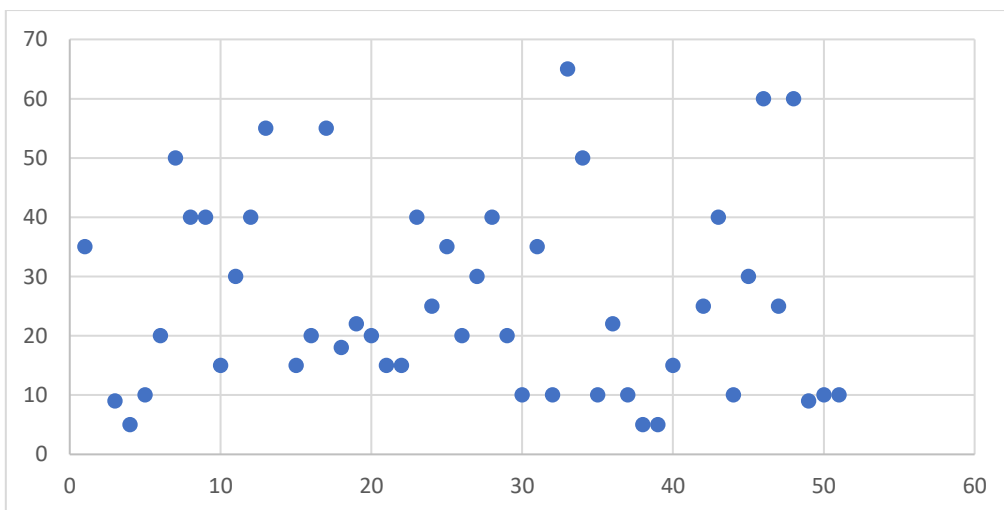


Figura 1.9. Distribuția Ki-67.

Activitatea 1.2.

Punctul de plecare pentru obținerea unui protocol FICTION (Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetic as a Tool for Investigation Of Neoplasia) adaptat determinării statusului HER2 în carcinoamele mamare invazive a fost reprezentat de lucrarea publicată de Maciej Giefing și Reiner Siebert(1). În această lucrare autorii au publicat in protocol de lucru care realizează secvențial pe același preparat histologic colorații imunofluorescente și hibridizare in situ.

Protocolul publicat de Maciej Giefing și Reiner Siebert pentru FICTION cuprinde următorii pași:

1. Incubați lamele cu secțiunile de parafină 3 × 5 min în RotiHistol la temperatura camerei.
2. Hidratați lamelele in alcool absolut, 80 % si 70% etanol timp de 5 minute fiecare la temperatura camerei.
3. Așezați lamele într-un suport de oțel și așezați suportul într-un borcan Coplin cu apa distilata.
4. Se fierbe 1 L 0,01 M soluție tampon citrat într-o oală sub presiune.
5. Încălziți oala sub presiune până ajunge la presiunea maximă și lăsați-o să fiarbă 160 s.
6. Răciți oala sub presiune sub apă rece de la robinet și eliberați treptat aburul.
7. Deschideți capacul și turnați cu grijă apă rece de la robinet înăuntru, dar nu direct pe suportul de lame.
8. Puneți suportul de lame într-un borcan Coplin cu apă distilată.
9. Uscați lamelele la aer timp de 30 de minute.
10. Fixați lamele timp de 10 min în acetona.
11. Turnați o picătură de tampon PN (vezi nota 1) pe lame și acoperiți-o cu plăcile de acoperire Shandon din plastic și atașați-le în rafturile Shandon și turnați 100 ml de tampon PN în pâlnie (Fig. 1).
12. După ce tamponul PN este aplicat se adaugă 100 ml de soluția de anticorp primar pentru colorarea imunohistochimică a secțiunii și se incubează timp de 30 de minute; acoperă suportul cu capacul atașat pentru a proteja diapozitivele de lumină (vezi Nota 11).
13. Se spală lamele cu 100 ml de tampon PN.
14. După ce tamponul PN este aplicat se adaugă 100 ml de soluția de anticorp secundar și se incubează timp de 30 min; acoperiți suportul cu capacul atașat pentru a proteja glisieră de lumina.
15. Fixați lamele într-un borcan Coplin în paraformaldehidă 1% timp de 2 min la temperatura camerei.
16. Spălați lamele într-un borcan Coplin cu apă distilată timp de 1 min la temperatura camerei.
17. Deshidratați lamele în 70; 85%; etanol abs. fiecare timp de 2 minute la temperatura camerei.

18. Uscați lamele la aer timp de 5 minute la temperatura camerei.
19. Aplicați 1,3 ml sondă pentru hibridizare. Pipetați sonda pe regiunea marcată anterior cu stiloul cu diamant având o densitate mare a celulelor (evitați expunerea la lumină).
20. Acoperiți regiunea de hibridizare cu sticlă de acoperire de \varnothing 10 mm). Evitați formarea bulelor de aer.
21. Acoperiți întreaga regiune de hibridizare cu cauciuc Fixogum ciment.
22. Transferați lamele de sticlă într-o cutie metalică de hibridizare cu capac și denaturați 7 min la 75°C într-o baie de apă.
23. Se hibridizează timp de 12–72 ore la 37°C într-un cuptor de hibridizare.
24. Puneți un borcan Coplin cu tampon de spălare 1 într-o baie de apă la 72°C.
25. Folosind o pensetă îndepărtați cu atenție cimentul de cauciuc Fixogum și lamela de sticlă.
26. Spălați lamele de sticlă într-un borcan Coplin cu 2× SSC pentru 1–10 min.
27. Puneți lamele în tampon de spălare cald la 72°C un ciclu de 2 minute.
28. Transferați lamelele de sticlă în tamponul de spălare doua cicluri de 1 minut la temperatura camerei.
29. Transferați lamelele de sticlă în 2× SSC timp de 2-10 minute la temperatura camerei.
30. Colorați lamele în DAPI timp de 5 minute la temperatura camerei.
31. Se spală o dată în 2x SSC timp de 3 minute la temperatura camerei.
32. Pune două picături Vectashield Mounting Medium pe un pahar umed glišați și acoperiți-l cu sticlă de acoperire de 124 × 60 mm.

Nota 1: Prepararea soluției tampon PN

Tampon PN: 13,8 g fosfat acid de sodiu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), 14,2 g hidrogenofosfat disodic (Na_2HPO_4), se ajustează la 1.000 ml cu apă distilată, pH 8,0, se păstrează la temperatura camerei până la 1 an.

După aplicarea protocolului mai sus descris am obținut următoarele rezultate prezentate în figura 1.10.

Rezultatele testelor inițiale au arătat faptul că partea de hibridizare in situ din protocolul FICTION a funcționat similar cu hibridarea in situ din tehnica FISH. Pentru a obține rezultatele așteptate- colorare sincronă imunofluorescentă și hibridizare in situ am rulat multiple protocoale pentru validarea fiecărui pas individual. Prima etapă a fost reprezentată de evaluarea individuală a protocolului de imunofluorescență. Pentru aceasta am rulat o versiune modificată a protocolului descris mai sus care exclude etapele dedicate hibridării in situ pașii 19 până la 25. Rezultatele colorațiilor imunofluorescente sunt prezentate în figura 1.11.

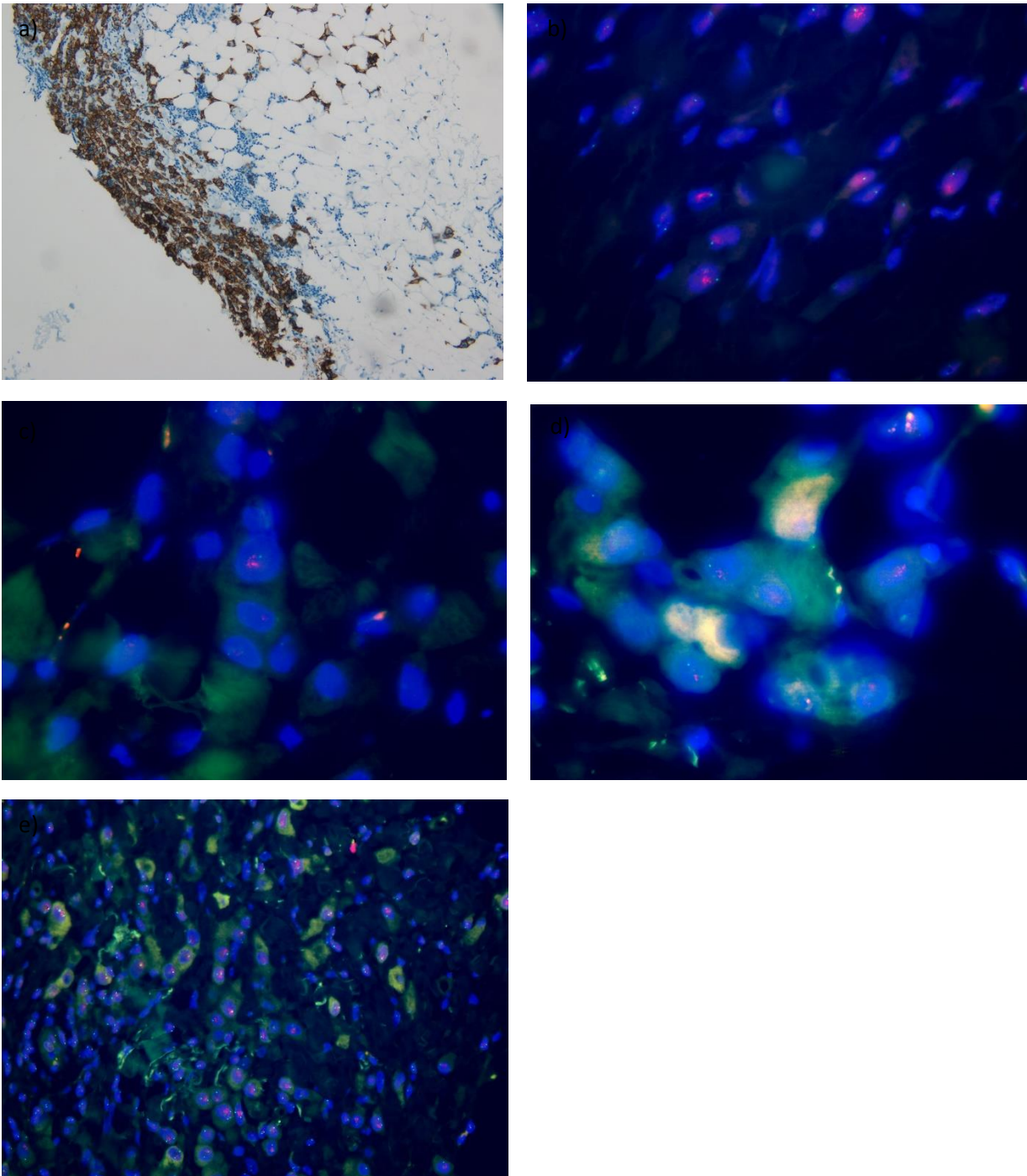


Figura 1.10. a). Colorație IHC pentru evaluarea HER2, carcinom mamar invaziv lobular pleomorf, scor 3+(pozitiv) obiectiv 4x. b). Același caz evaluat prin tehnica FISH cu sonda HER2 Pathvysion II (Abbot Molecular) sunt prezente celule tumorale ce prezintă copii suplimentare pentru gena HER2 (fluorocrom roșu) care realizează clustere pentru gena HER2. Obiectiv 100x cu imersie, examinare în lumină fluorescentă, filtre FITC, TRITC, DAPI. c).și d). Protocol FICTION HER2 IF + HER2 FISH, 100x cu imersie examinare în lumină fluorescentă, filtre FITC, TRITC, DAPI; se observă rezultate similare pentru hibridizarea in situ și un fond de fluorescență citoplasmatic care a fost interpretat ca legare nespecifică a anticorpului secundar, fără a se observa colorație fluorescentă la nivel membranar. e). Protocol FICTION HER2 IF + HER2 FISH, 60x fără imersie examinare în lumină fluorescentă, filtre FITC, TRITC, DAPI; se observă rezultate similare pentru hibridizarea in situ și un fond de fluorescență citoplasmatic care a fost interpretat ca legare nespecifică a anticorpului secundar, fără a se observa colorație fluorescentă la nivel membranar.

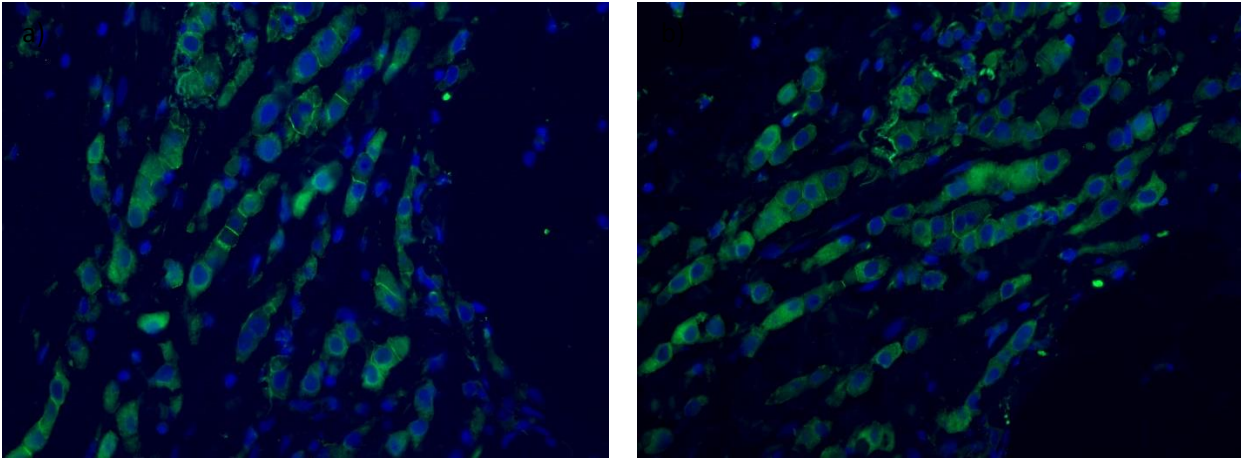


Figura 1.11. Imunofluorescență pentru HER2 obiectiv 60x, fără imersie, examinare fluorescentă folosind filtrele FITC și DAPI. a). Prelungirea timpului de incubare cu anticorpul secundar la 60 minute b). Creșterea concentrației anticorpului secundar 1:25.

Se observă că în ambele imagini este clar vizibilă expresia membranară a HER2. Rezultatele sunt similare pentru ambele variante de protocol rulate. Cu toate acestea comparativ cu rezultatele așteptate prezentate în imaginea de referință (figura 10.a.) expresia HER2 a fost cu mult sub așteptări. Următorul pas a fost reprezentat de modificarea timpilor de spălare. În ambele protocoale desfășurate mai sus s-au utilizat timpii de spălare specifici hibridizării in situ, pașii 26-32 din protocolul original. Acești pași s-au înlocuit cu o spălare mai apropiată ca timp și, mai ales ca valori ale temperaturii soluției de spălare, cu cea utilizată în colorațiile IHC uzuale. În esență prin scăderea temperaturii soluției de spălare am redus stringența acestei etape.

Am repetat protocolul FICTION cu modificarea timpilor de spălare, însă imunofluorescența nu s-a conservat. Impactul noilor timpi de spălare asupra calității hibridizării in situ a fost evaluat ca neglijabil ceea ce ne-a determinat să luăm în considerare acești timpi pentru protocolul final.

Următorul pas a fost reprezentat de evaluarea secvențială după fiecare etapă finalizată din protocolul FICTION. S-au evaluat lamele colorate după etapa de IF și s-au observat rezultate similare cu figura 11.11. Deoarece preocuparea majoră a fost reprezentată de utilizarea în protocolul de hibridizare in situ a unei temperaturi de 75 ° Celsius, în etapa de denaturare care durează 7 minute și care se realizează după aplicarea sondei, în hibridizator, s-au colorat lamele de test IF, s-a verificat prezența colorație membranară și s-au trecut prin etapa de denaturare. După această etapă protocolul de lucru a fost întrerupt și s-au evaluat lamele din nou. S-a observat faptul că colorația IF membranară pentru HER2 a dispărut după etapa de denaturare. Explicația acestui fapt este reprezentată de expunerea specimenului colorat IF la temperaturi înalte, de peste 56 ° Celsius, ceea ce poate conduce la ruperea legăturilor dintre antigen(proteina HER2 membranară) și anticorpul primar, dintre anticorpul primar și cel secundar sau ruperea ambelor.

Ținând cont de aceste observații am considerat oportună modificarea etapelor de hibridizare in situ și IF, prin utilizarea unui protocol în care sunt parcurse în ordine inversă etapele de hibridizare in situ și fluorescentă, rezultatele fiind prezentate în figura 1.12.

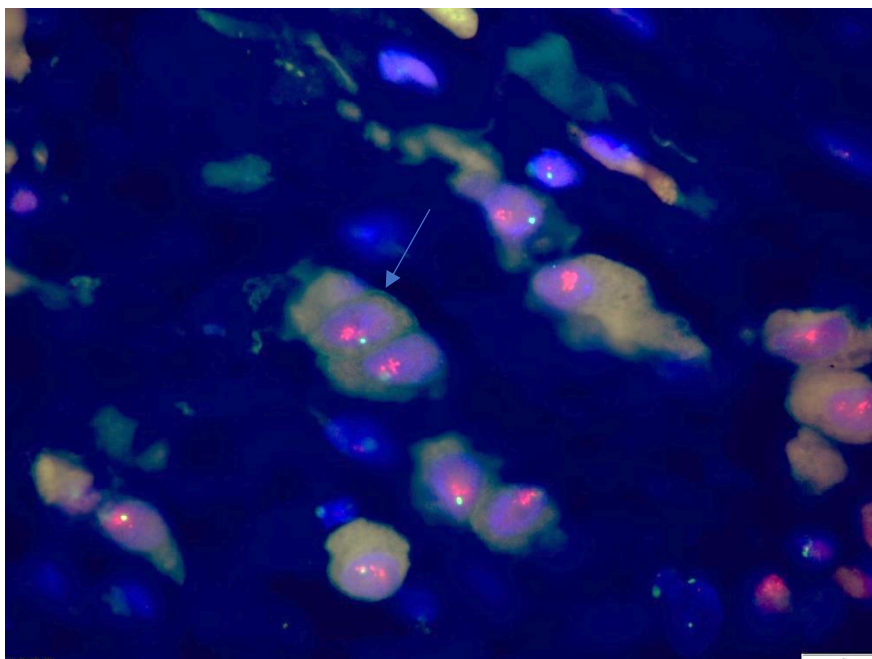


Figura 1.12. Protocol FICTION cu timp de lucru pentru ISH si IF inversați. Se observă colorare membranară slabă IF pentru HER2 (săgeată).

Acest protocol modificat ne-a permis să obținem pentru prima dată colorare IF membranară simultană pentru HER2 și semnale corespunzătoare hibridizării in situ. Cu toate acestea ținând cont de aspectul colorației referință IHC (figura 1.10 a.), rezultatele în ceea ce privește intensitatea și expresia HER2 IF au necesitat ajustări suplimentare a protocolului de lucru. Astfel, pentru protocolul final am prelungit timpul de demascare de la 2 minute la 20 minute și am modificat protocolul de spălare înlocuind protocolul tipic utilizat pentru hibridizarea in situ cu cel utilizat de rutină pentru tehnica IHC.

Astfel protocolul final a cuprins următorii pași:

PROTOCOL FICTION OPTIMIZAT

1. Din blocurile de parafina efectuați secțiuni la 4 μm și se întind pe lame silanate
2. După secționare, lamele se incubează minim 2 ore la 56°C sau peste noapte la temperatura de 37°C pentru învechire
3. Imersați lamele în 3 băi consecutive de xilen, câte 5 minute în fiecare baie
4. Treceți apoi în două băi de alcool etilic absolut, câte un minut în fiecare baie
5. Spălarea lamelor în apa curentă.
6. Așezați un suport de oțel sau borcan Coplin ce conține soluție tampon citrat pH=6, 0.01 M în oala cu presiune.
7. Încălziți oala sub presiune până ajunge la fierbere, se pune capacul și lăsați-o să fiarbă 20 minute la temperatura de 100 gr C.
8. Răciți oala sub presiune sub apă rece de la robinet și eliberați treptat aburul.

9. Deschideți capacul.
10. Puneți suportul de lame într-un borcan Coplin cu apă distilată.
11. Uscați lamelele la aer timp de 10 de minute.
12. Fixați lamele timp de 10 min în acetonă.
13. Spălați lamele în 100 ml de soluție tampon PN
14. Deshidratați lamele în 70; 85%; etanol abs. fiecare timp de 2 minute la temperatura camerei.
15. Uscați lamele la aer timp de 5 minute la temperatura camerei.
16. Aplicați 10 μ l sondă pentru hibridizare (PathVysion LSI HER-2/neu SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen Probes). Pipetați sonda pe regiunea marcată anterior cu stiloul cu diamant (evitați expunerea la lumină).
17. Acoperiți regiunea de hibridizare cu sticlă de acoperire de \varnothing 10 mm). Evitați formarea bulelor de aer.
18. Acoperiți întreaga regiune de hibridizare cu cauciuc Fixogum ciment.
19. Transferați lamele de sticlă într-o cutie metalică de hibridizare cu capac și denaturați 7 min la 75°C într-o baie de apă.
20. Se hibridizează timp de 16 ore (peste noapte) la 37°C într-un cuptor de hibridizare.
21. Puneți un borcan Coplin cu tampon de spălare 1 într-o baie de apă la 72°C și unul la temperatura camerei.
22. Folosind o pincetă îndepărtați cu atenție cimentul de cauciuc Fixogum și lamela de sticlă, se introduc în soluția tampon de la temperatura camerei apoi se spală excesul de sonda la temperatura de 72 gr C timp de 2 minute și 15 secunde. Se transvazează lamele din nou în soluția tampon aflată la temperatura camerei.
23. Se spală lamele cu 100 ml de tampon PN.
24. Incubați lamele cu 100 μ l de soluția de anticorp primar pentru colorarea imunohistochimică a secțiunii și se incubează timp de 30 de minute ferit de lumina.(Recombinant Anti-ErbB2 / HER2 antibody [clona CAL27] (ab237715), Rabbit monoclonal, diluție 1:50)
25. Se spală lamele cu 100 ml de tampon PN.
26. După ce se spală, se adaugă 100 μ l de soluția de anticorp secundar și se incubează timp de 30 min(Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (ab6717), diluție 1:10); acoperiți suportul cu capacul atașat pentru a proteja de lumina.
27. Spălați lamele de sticlă într-un borcan Coplin cu 2 \times SSC, temperatura camerei, pentru 1–10 min în 2 bai consecutive.
28. Se usucă lamele
29. Se aplica DAPI pe secțiune la întuneric
30. Se montează lamela.

Rezultatele acestui protocol FICTION sunt prezentate în figura 1.13. A fost necesară utilizarea unui alt bloc de parafină datorită riscului de epuizare a materialul biopsic din primul bloc selectat. S-a selectat blocul din care sunt secționare secțiunile de control 3+ pe lamele care se colorează IHC pentru HER2. Se observă că rezultatele sunt cele așteptate.

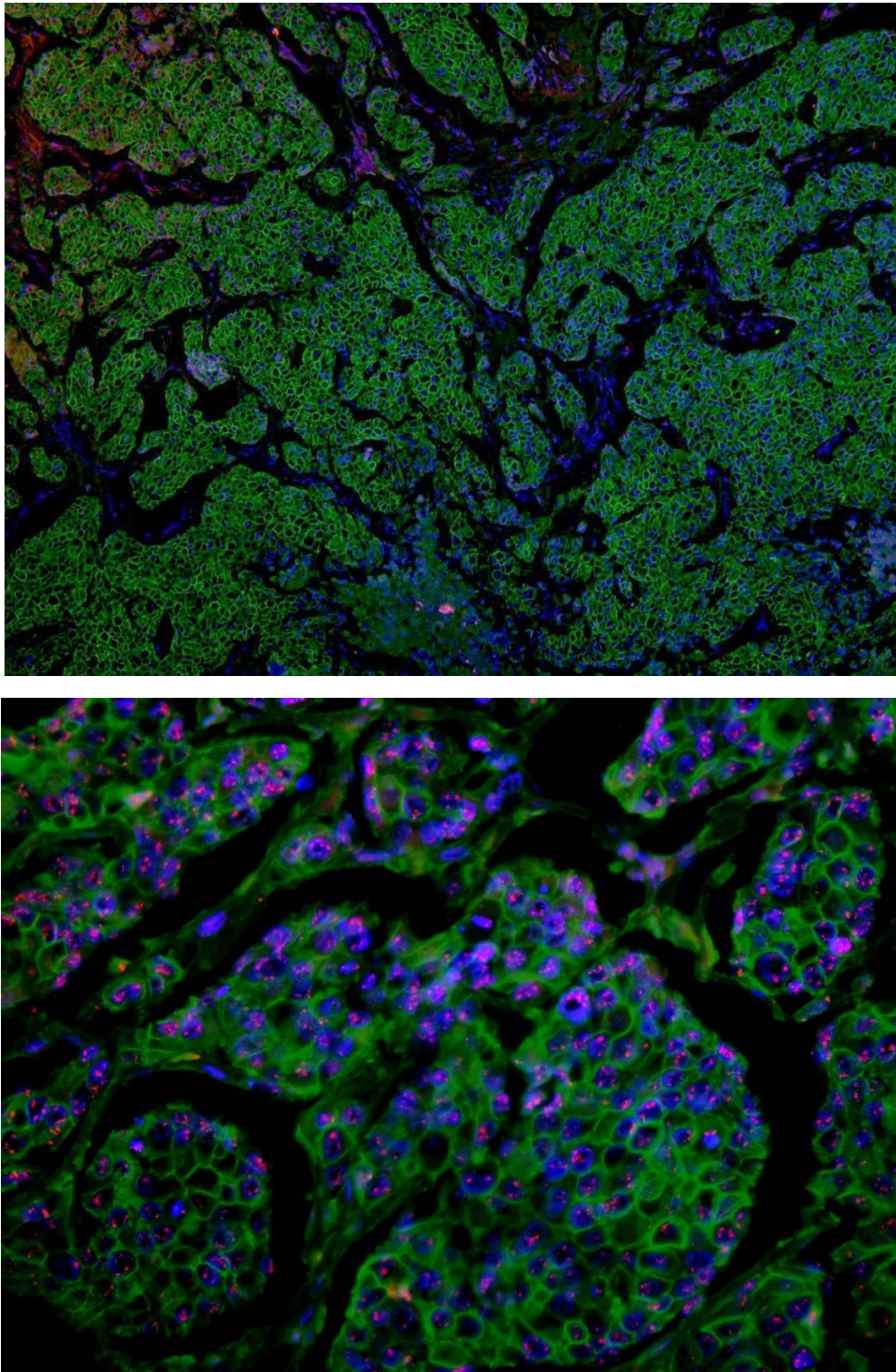


Figura 1.13. Protocol FICTION final. Se observă colorare membranară intensă IF pentru HER2 și hibridizare in situ cu prezenta de clustere pentru gena HER2. a) 40x, fără imersie, examinare în lumină fluorescentă cu filtrele FITC,TRITC și DAPI. b). 100x,imersie, examinare în lumină fluorescentă cu filtrele FITC,TRITC și DAPI.

Am aplicat acest protocol cu succes pe specimene recoltate de la nivelul glandei mamare, de la nivelul limfoganglionilor limfatici locoregionali ce conțin metastaze și pe secțiuni de la nivelul tegumentului infiltrat tumoral. De asemenea, am aplicat protocolul de mai sus pe secțiuni prelevate prin puncție biopsie sau pe specimene de excizie cu și fără terapie neoadjuvantă. Rezultatele obținute au fost similare.

De asemenea, pentru a exclude reactivitate încrucișată cu anticorpul secundar am efectuat o colorație IF de control fără anticorpul primar (figura 1.14).

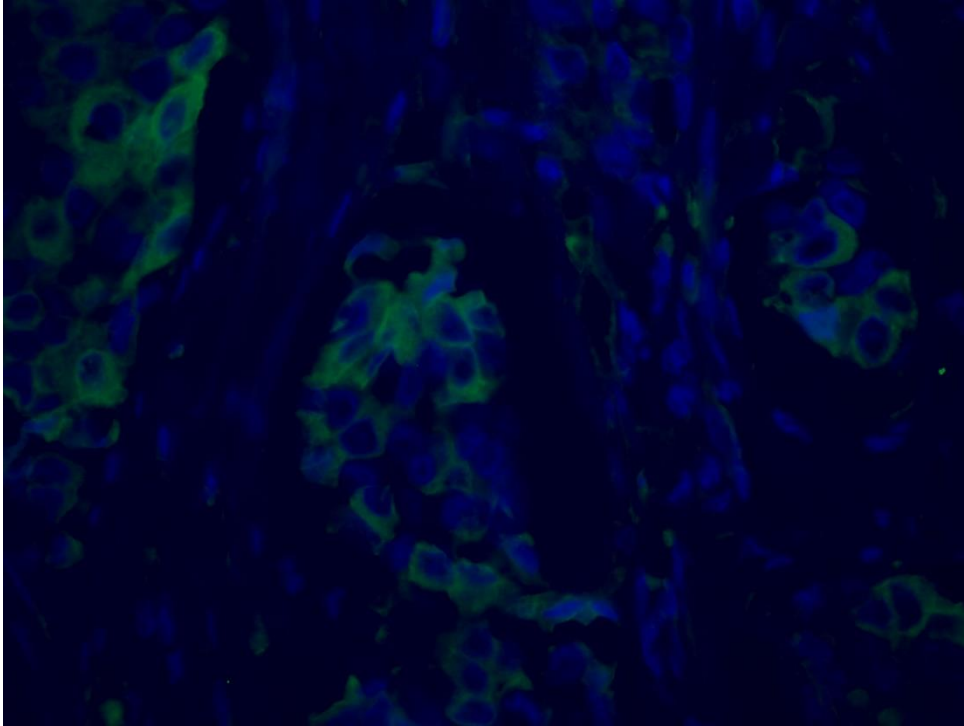


Figura 1.14. Protocol de IF de control fără anticorpul primar 100 x, imersie examinare fluorescentă filtrele FITC și DAPI. Se observă legarea nespecifică dată de anticorpul secundar la nivel citoplasmatic și absența colorației membranare.

Dr. Bogdan POP

Dr. Ovidiu BĂLĂCESCU

Dr. Adrian TRIFA

Director proiect, Dr. Bogdan FETICA

Bibliografie

1. Giefing M, Siebert R. FISH and FICTION to detect chromosomal aberrations in lymphomas. *Methods Mol Biol.* 2013;971:227-44.
2. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, 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. *J Clin Oncol.* 2018;36(20):2105-22.
3. Gatta LB, Incardona P, Cadei M, Grigolato P, Simoncelli S, Balzarini P. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and Her-2/neu genotyping (FICTION) in breast carcinoma candidates to target therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(4):413-20.
4. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1992;40(2):171-5.
5. Ikeda S. Novel and simple method of double-detection using fluorescence in situ hybridization and fluorescence immunostaining of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Oncol Lett.* 2018;15(1):1084-8.
6. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006;8(2):141-51.
7. WHO classification of tumours editorial board. Breast tumours. WHO classification of tumours series, 5th ed. IARC, Lyon, 2019.