راهنمای انجام آزمایش HER-2 به روش FISH

مرحله قبل از انجام آزمایش

الف : پذیرش نمونه

- درخواست انجام آزمایش همراه با مشخصات کامل بیمار و اطلاعات بالینی مورد نیاز (درصورت دسترسی به سامانه اطلاعاتی به این مورد نیاز نیست)
- یک نسخه از گزارش پاتولوژی اولیه و آزمایش ایمنوهیستوشیمی انجام شده (درصورت دسترسی به سامانه اطلاعاتی به این مورد نیاز نیست)
- اسلاید H&E و بلوکهای پارافینی حاوی بافت تومورال قابل تطبیق با گزارش آن (پذیرش نمونه پس از تایید وجود و کفایت بافت تومورال و تایید عدم وجود فاکتورهای مداخله کننده مانند CIS[1] به میزان زیاد در بلوک/بلوکهای ارسالی توسط پاتولوژیست انجام می‌گیرد)
- مشخص نمودن فیکساتیو اولیه / مدت زمان فیکساسیون/ روش پروسسینگ (چنانچه غیر از روش معمول انجام گرفته باشد)

ب: شرایط لازم جهت انجام آزمایش FISH[2]

- کلیه نمونه‌ها باید بلافاصله بعد از برداشت و در کمتر از مدت 1 ساعت در فیکساتیو قرار گیرند. قبل از قرار دادن در فیکساتیو، نمونه باید با ضخامت 5 تا 10 mm برش داده شود و در صورت لزوم بین برشها گاز گذاشته شود.
- فیکساتیو مناسب برای این آزمایش فرمالین بافری 10% است
- استفاده از هر نوع فیکساتیو دیگر، فقط پس از انجام مطالعات مقایسه‌ای و در صورت تائید انجام گیرد.
- استفاده از فیکساتیوهای انعقادی حاوی الکل و کلرید جیوه مجاز نیست.
- میزان فیکساتیو باید حداقل چهار برابر حجم توده باشد.

[1]- Carcinoma in situ
[2]- Fluorescence in situ hybridization

- مدت زمان مطلوب فیکساسیون: 48-6 ساعت است (بیش از 48 ساعت توصیه نمی‌شود زیرا سبب ایجاد نتایج منفی کاذب می‌گردد. برای جلوگیری از این وضعیت باید تغییراتی در مرحله هضم آنزیمی هنگام انجام FISH بوجود آورد).

مرحله انجام آزمایش

الف - تهیه برش از بلوک‌های پارافینی

- بطور کلی بهتر است وسایل مربوط به تهیه اسلاید برای FISH از سایر کارهای روزانه جدا باشند.
- میکروتوم و سایر وسایل مخصوص تهیه اسلاید برای FISH باید هر بار قبل از تهیه نمونه با الکل تمیز شوند.
- هنگام تهیه برش برای FISH باید از دستکش استفاده شود.
- ضخامت برش‌ها باید بین 4 تا 6 µm باشند.
- اسلایدهای مورد استفاده باید دارای بار مثبت[3] باشند. برای تهیه این اسلایدها می توان از محلول APTES[4]، سیلان‌های مشابه یا پلی ال لیزین[5] استفاده نمود.
- پس از برش بلوک، اسلایدهای تهیه شده باید حداقل 1 ساعت در دمای 60ºC قرار داده شوند.
- حداکثر زمان مجاز نگهداری اسلایدها قبل از انجام آزمایش 6 هفته است.

نکته :در صورتی که اسلایدها به مدت طولانی قبل از FISH نگهداری شده بودند و جواب آزمایش FISH منفی باشد، این مورد باید در جواب نهایی، قید گردد.

ب - پارافین‌زدایی[6]

مراحل انجام و مدت زمان هر مرحله بسته به دستورالعمل کیت مورد استفاده ممکن است متفاوت باشد.

ج – آماده سازی اولیه[7]

- هدف از انجام این مرحله حذف باندهای دی‌سولفیدی ایجاد شده توسط فرمالین و نیز دناتوره کردن پروتئینها و جداسازی آنها از DNA برای فراهم کردن امکان اثر پروتئازها برای هضم پروتئینی در مراحل بعدی است.
- زمان اندک این مرحله می‌تواند باعث ایجاد اتوفلورسانس ناشی از باقی ماندن پروتئین در زمینه شود.

---

[3] Positive charged slides
[4] (3-aminopropyl)-triethoxysilane
[5] Poly-L-lysine
[6] Deparaffinization
[7] Pretreatment

- زمان بیش از حد نیز می‌تواند منجر به از بین رفتن مورفولوژی گردد. بیشترین آسیب در این موارد به غشا هسته وارد می‌شود. باید در نظر داشت با توجه به قرارگیری سنترومرها (سیگنال کنترول) در کنار غشا هسته این مورد می‌تواند منجر به کاهش کاذب سیگنال کنترل گردد.
- روشهای متعددی برای این مرحله پیشنهاد شده‌اند که بسته به نوع کیت مورد استفاده، تفاوتهایی دارند.

د- هضم آنزیمی:

- از مهمترین مراحل در آزمایش FISH مرحله هضم آنزیمی است که کفایت آن در نتیجه نهایی تاثیر مستقیم دارد. در این مرحله پروتئینهای زمینه و باند شده به DNA هضم می‌شوند، اتوفلورسانس زمینه از بین می‌رود و امکان هیبریدیزاسیون فراهم می‌شود. برخی از پروتکل‌ها برای این مرحله استفاده از سرین پروتئازها مانند پروتئیناز K را توصیه می‌کنند. اما روش‌های ملایم تر با استفاده از کربوکسیل پروتئازها مانند پپسین ارجح است.
- طول مدت این مرحله بسته به زمان فیکساسیون اولیه متفاوت است. هر چه زمان فیکساسیون بیشتر باشد زمان هضم آنزیمی باید طولانی تر باشد. باید به این نکته توجه داشت که بازه زمانی و غلظت پپسین مورد استفاده در این مرحله برای کیتهای مختلف متفاوت است. زمان هضم آنزیمی باید برای بافتهای گوناگون به صورت تجربی در هر آزمایشگاه استاندارد شود.
- کفایت این مرحله به سه روش زیر قابل ارزیابی است
  1. میزان اتوفلورسانس
  2. کیفیت رنگ‌پذیری فلوئورسنس DNA هسته
  3. میزان توزیع سیگنال
- پس از هضم آنزیمی، شستشو و خشک کردن اسلاید، مقداری رنگ فلوئورسانس مخصوص هسته به اسلاید اضافه نموده و در زیر میکروسکوپ، اتوفلورسانس و کیفیت رنگ پذیری را بررسی می‌نماییم. در صورت ناکافی بودن میزان هضم آنزیمی، باید مجددا هضم آنزیمی را با زمان مناسب تکرار کرد.

۱- اتو فلورسانس (نشان‌دهنده هضم آنزیمی ناکافی است)

پروتئینها دارای خاصیت اتوفلورسانس هستند و هضم ناکافی آنها منجر به باقی ماندن آنها به‌خصوص در داخل سیتوزول و فضاهای بین سلولی می‌شود. اتوفلورسانس ناشی از پروتئینها معمولا در طیف رنگی سبز قرار می‌گیرد.

- وجود اندکی اتوفلورسانس در هسته معمولا طبیعی است.
- زیاد بودن اتوفلورسانس می‌تواند باعث تداخل در هیبریدیزاسیون ناشی از باقی ماندن پروتئین‌ها شود.
- در صورت زیاد بودن اتو فلورسانس در سیتوزول و ماتریکس بین‌سلولی، اسلاید تهیه شده برای انجام آزمایش قابل قبول نیست.
- اتوفلورسانس تنها امکان ارزیابی هضم اندک را فراهم می‌کند و در ارزیابی هضم بیش از اندازه نقشی ندارد.

۲-کیفیت رنگ فلورسانس هسته

مـواد فلورسـانس متعـددی دارای خاصـیت اتصـال بـه DNA هسـتند کـه در روش‌هـای فلورسـانس بـرای رنـگ‌آمیـزی هسـته به‌کار می‌روند که شایعترین آنها DAPI[8] است

- بررسی کیفیت رنگ‌پذیری هسته در ارزیابی هضم آنزیمی موثر است.
- هضم آنزیمی ناکافی سبب ایجاد اختلال در این اتصال می‌شود و در نتیجه رنگ هسته هتروژن خواهد بود.
- هضم آنزیمی بیش از حد باعث ایجاد اشکال حلقه ای[9] و از هم گسیختگی غشا هسته می‌شود.

3- میزان توزیع سیگنال

در هضـم بـیش از حـد ابتـدا مرکـز هسـته از بـین مـی‌رود کـه ایـن امـر باعـث کـاهش سـیگنال HER2 و افـزایش سـیگنال کنترل نسبت به سیگنال HER2 می‌شود. در این حالت آزمایش FISH باید تکرار گردد.

ه- دناتوراسیون و هیبریدیزاسیون

- در مرحلـه اول بایـد پـروپ مـارکردار و DNA نمونـه، در دمـای بـالا از حالـت دو رشـته‌ایـی خـارج شـوند. سـپس در دمای پایین تر پروب مارکردار به توالی مکمل خود روی DNA نمونه متصل می‌شود.
- بـرای دناتوراسـیون از ترکیـب فورمامیـد، pH و دمـا اسـتفاده مـی‌شـود (غلظـت فورمامیـد، دمـا و زمانبنـدی بـرای کیتهای مختلف متفاوت است).
- پـس از دناتوراسـیون، هیبریدیزاسـیون بـا پروبهـای اختصاصـی در دمـا و زمـان توصـیه شـده توسـط کیـت، انجـام می‌شود (به روش دستی یا با استفاده از هیبریدایزر).
- پـس از هیبریدیزاسـیون پـروب اضـافی بـا اسـتفاده از بـافر شستشـو در دمـا و زمـان توصـیه شـده در کیـت حـذف می‌شود.
- پس از شستشو رنگ فلورسانس هسته به اسلایدها اضافه می‌شود و لامل گذاری انجام می‌گیرد.
- اسلایدها باید در دمای 20C – نگهداری شوند و قبل از مطالعه در دمای اتاق قرار گیرند.

و- بررسی اسلایدها

برای بررسی و شمارش موارد زیر باید رعایت شوند:

- در هـر مـورد بایـد بـه طـور همزمـان اسـلاید H&E از نمونـه تهیـه شـود و بـه ازاء هـر 10 بـرش، ایـن اسـلاید بایـد تجدید گردد.
- قبـل از ارزیـابی اسـلاید FISH، اسـلاید H&E بایـد توسـط پاتولوژیسـت مسـوول ارزیـابی FISH، بـازبینی و نقـاط مورد نظر برای شمارش تعیین گردد.
- محل تومور باید در روی اسلاید H&E مشخص شده و همزمان روی اسلاید FISH بازیابی گردند.

[8] 4',6-diamidino-2-phenylindole
[9] Doughnut

- قسمت های نکروزه و نامناسب در اسلاید باید مشخص شده و روی اسلاید FISH بازیابی شوند تا از شمارش در این مناطق پرهیز شود.
- محل کارسنیوم In situ باید مشخص شود تا از شمارش در این مناطق پرهیز گردد. درصد بالایی از موارد کارسنیوم In situ از نظر HER2 مثبت هستند که عدم توجه به این مورد می‌تواند منجر به آمار مثبت کاذب فراوان شود.
- پس از مطابقت اسلاید FISH با اسلاید H&E باید ابتدا تمام قسمتهای تومورال اسلاید FISH اسکن شود تا هتروژنسیتی احتمالی شناسایی گردد. سپس حداقل دو نقطه به صورت تصادفی برای شمارش انتخاب شود. اگر در اسکن اولیه بصورت هتروژن قسمتهایی دارای سیگنال مثبت بودند آن مناطق باید برای بررسی درصد هتروژنسیتی برای شمارش انتخاب شوند.
- شمارش سلولی در هر منطقه باید بصورت راندوم از میان سلولهای دارای حداقل معیار شمارش، انتخاب شود. این معیارها عبارتند از وجود سلول تکی بدون روی هم افتادگی، غشا سلولی سالم و حداقل وجود یک سیگنال HER2 و یک سیگنال کنترل در آن (در صورت استفاده از کنترل). پیشنهاد شده است برای جلوگیری ازخطا در انتخاب سلولهای با سیگنال بیشتر برای شمارش، انتخاب سلولها برای شمارش توسط فیلتر DAPI انجام شود.
- برای دیدن تمام سیگنالها در یک هسته نیاز به تغییر فوکوس وجود دارد.
- مهمترین نکته در شمارش، وجود حداقل دو منطقه تومورال در اسلاید تهیه شده و شمارش در این دو منطقه است.
- حداقل 20 سلول باید در این مناطق شمارش شوند.
- شمارش باید توسط 2 تکنیسین آموزش دیده به طور جداگانه انجام شود.
- شمارش و محل آن باید توسط پاتولوژیست تائید شود و کل اسلاید از نظر هتروژنسیتی توسط پاتولوژیست اسکن گردد.
- در هنگام شمارش باید به طور همزمان نمونه های کنترل شامل موارد مثبت، منفی و نامشخص بررسی گردد و در صورت وجود هر گونه اشکال در نتیجه کنترل‌ها، کل نمونه‌های تهیه شده در سری کاری نامعتبر و غیرقابل قبول بوده و پس از شناسایی و رفع نقص، کل روند باید تکرار گردد (اقدامات انجام شده و نتایج بدست آمده باید بطور کامل ثبت شوند).
- در هر سلول باید تعداد سیگنالهای HER2 (معمولاً قرمز رنگ، به بروشور کیت مراجعه شود) و در صورت استفاده از کنترل داخلی، سیگنالهای کنترلی قسمت سنترومر کروموزم 17 (CEP 17) (معمولاً سبز رنگ، به بروشور کیت مراجعه شود) شمارش گردند.
- در صورت به دست آمدن عدد 2/2 – 1/8 در نسبت $HER_2/CEP17$ (در موارد استفاده از کنترل داخلی) یا عددی از 4 تا 6 در شمارش HER2 (در موارد عدم استفاده از کنترل داخلی) باید 20 سلول دیگر نیز شمارش شوند. در صورتی که مجددا اعداد فوق حاصل شدند، تست باید تکرار گردد و در صورتی که نتیجه

مجـدد نیـز یکسـان بـود بایـد توسـط انجـام IHC مجـدد در همـان آزمایشـگاه نتیجـه تاییـد گـردد. در ایـن مـوارد پیشنهاد شده است موارد با نسبت بالای 2 تحت درمان با تراستوزوماب[10] قرار گیرند.

- نتیجـه شـمارش هـر یـک از تکنیسـین‌هـا بایـد در فـرم شـمارش اولیـه ثبـت شـود و در نهایـت میـانگین خـام سـیگنالهای HER_2، CEP17 و نسـبت $HER_2/CEP17$ (در مـوارد اسـتفاده از کنتـرل داخلـی) محاسـبه گردد.
- نتیجه نهایی باید توسط پاتولوژیست مسوول تایید گردد و در برگه شمارش ثبت شود.
- در هر آزمایشگاه باید یک فرم شمارش تهیه گردد که در آن موارد زیر ثبت شود:

ü تـاریخ، نـام و شـماره پـذیرش بیمـار، تشـخیص پـاتولوژی اولیـه، نتیجـه IHC ، شـماره Lot کیـت مـورد استفاده

ü وضـعیت HER_2 و CEP17 در هـر یـک از 20 سـلول شـمارش شـده (بهتـر اسـت جـدولی بـرای ثبـت این موارد در فرم طراحی شود)

ü آمار نهایی کل سیگنالها و نسبت $HER_2/CEP17$ (در موارد استفاده از کنترل داخلی)

ü وجود پلی‌زومی و هتروژنسیتی

ü تفسیر نهایی

ü نام تکنسین‌ها و پاتولوژیست بررسی کننده اسلایدها

ز - نکات مهم در هنگام شمارش سیگنالها

- دو سیگنال هم اندازه کـه بـه فاصـله کمتـر یـا مسـاوی یـک سـیگنال از یکـدیگر قـرار گرفتـه‌انـد بایـد بـه عنـوان یـک سیگنال در نظر گرفته شوند.
- هسـته‌هـایی کـه یـک نـوع سـیگنال دارنـد (تـک سـیگنال بـا یـک رنـگ) یـا بـدون سـیگنال هسـتند، در شـمارش محاسبه نمی‌شوند.
- در مـواردی کـه قسـمتی از هسـته‌هـا روی هـم افتـاده اسـت چنانچـه کلیـه سـیگنالهای در قسـمت خـارج از روی هـم افتادگی باشند شمارش بلامانع است و به تعداد سیگنالها باید انجام شود.
- شمارش در قسمتهایی که سلول ها کاملا روی هم افتادگی دارند نباید انجام شود.
- سلولهای با هضم شدگی بیش از حد نباید شمارش شوند.
- در مـواردی کـه میـزان آمپلیفیکاسـیون HER2 زیـاد اسـت سـیگنالها بـه صـورت خوشـه‌ای در هسـته تجمـع مـی‌یابنـد. در ایـن مـوارد تعـداد سـیگنالها بایـد تخمـین زده شـوند. توجـه بـه ایـن نکتـه ضـروری اسـت کـه در ایـن حالـت ممکـن اسـت سـیگنال CEP17 از نظـر دور بمانـد. بـرای جلـوگیری از ایـن حالـت بایـد از فیلتـر تکـی مخصوص سیگنال CEP17 استفاده شود تا بتوان تنها سیگنالهای CEP17 را مشاهده نمود.

[10] Trastuzumab

ح - پلی زومی

پلی‌زومی در 8% تومورهای پستان دیده می‌شود که با 4 تا 6 کپی ژن HER2 همراه است. در موارد پلی‌زومی (شامل 3 یا بیشتر CEP17 به همراه افزایش متناظر HER2) دیده شده است که در اغلب موارد mRNA یا پروتئین HER2 افزایش نمی‌یابد. این حالت در موارد بررسی HER2 بدون CEP17 که نتیجه شمارش از 4 تا 6 نشان می‌دهند نیز تایید شده است.

بنابراین طبق شواهد موجود در حال حاضر پلی‌زومی به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته نمی‌شود ولی باید در گزارش نهایی به آن اشاره شود.

ط - هتروژنسیتی ژنتیکی (GH[11])

وجود بین 5 تا 50% سلول با شمارش بیشتر از 6 سیگنال HER2 در موارد عدم استفاده از کنترل داخلی یا نسبت HER2/CEP17 بین 1/8 تا 2/2 در موارد استفاده از کنترل داخلی، در میان سلولهای دارای سیگنال طبیعی، بیانگر وجود GH است. بدیهی است در صورت وجود بیش از50% سلولها با شرایط فوق، شمارش یا نسبت نهایی در گروه با نتیجه مثبت قرار خواهد گرفت.

- در صورت وجود GH در شمارش علاوه بر نتیجه نهایی باید عبارت زیر نیز ارائه شود
  ‘‘*HER2* Genetic Heterogeneity is present. See comment.’’
- در توضیح[12] تکمیلی باید موارد زیر گزارش شوند:
  - درصد سلولهای نشان‌دهنده هتروژنسیتی
  - نحوه آرایش این سلولها در میان سلول‌های منفی (پراکنده[13]، تجمعی[14])
  - در موارد آرایش تجمعی، شمارش یا نسبت سیگنالی در آن منطقه باید جداگانه ارائه شود و وجود هیستولوژی متفاوت احتمالی در آن منطقه با مراجعه به اسلاید H&E گزارش شود.
- در صورت مشاهده GH در نمونه بیوپسی باید گزارش نمود که نتیجه به دست آمده قابل اعتماد نیست و بهتر است روی نمونه اصلی تکرار شود.
- در حال حاضر اهمیت کلینیک وجود GH و تغییر روش درمانی مشخص نیست و نیازمند انجام تحقیقات بیشتر است.

ی - شرایط نیازمند تکرار آزمایش

- ضعیف بودن سیگنال‌ها در بیش از 25% سلولها

[11] Genetic Heterogeneity
[12] Comment
[13] Scatterd
[14] Cluster

- وجود بیش از 10% سیگنالها در داخل سیتوپلاسم
- وجود اتوفلورسانس شدید در سیتوپلاسم و ماتریکس زمینه
- وجود کمتر از دو منطقه تومورال در اسلاید
- وجود کمتر از 20 سلول تومورال
- عدم امکان افتراق مناطق کارسینوم درجا از کارسینوم مهاجم در صورت مثبت بودن مناطق کارسینوم درجا
- عدم رنگ‌پذیری مناسب نمونه‌های کنترل

ک – تفسیرنتایج

- **مثبت**: میانگین سیگنالهای HER2 بیشتر از 6 عدد به ازاء هر هسته در موارد عدم استفاده از سیگنال کنترل داخلی یا نسبت HER2/CEP17 بیشتر از 2/2 در موارد استفاده از سیگنال CEP17 به عنوان کنترل داخلی
- **نامشخص**[15]: میانگین سیگنالهای HER2 از 4 تا 6 به ازاء هر هسته در موارد عدم استفاده از سیگنال کنترل داخلی یا نسبت HER2/CEP17 بین 1/8 تا 2/2 در موارد استفاده از سیگنال CEP17 به عنوان کنترل داخلی
- **منفی**: میانگین سیگنالهای HER2 کمتر از 4 به ازاء هر هسته در موارد عدم استفاده از سیگنال کنترل داخلی یا نسبت HER2/CEP17 کمتر از 1/8 در موارد استفاده از سیگنال CEP17 به عنوان کنترل داخلی
- **غیر قابل تفسیر**[16]: وجود هر یک از شرایط موجود در بند "ی" که با تکرار یا تعویض بلوک حل نشود.

لازم به ذکر است در 4% موارد عدم تطابق بین نتیجه IHC و FISH در مورد HER2 دیده شده است. شرایط بالینی و اقدام لازم در این موارد هنوز تبیین نشده است.

ل – گزارش نهایی

- برگه گزارش نهایی باید حاوی اطلاعات زیر باشد:
  - مشخصات بیمار
  - مشخصات پزشک درخواست کننده
  - تاریخ پذیرش و تاریخ گزارش
  - مشخصات نمونه (شماره پذیرش)
  - محل نمونه
  - نوع نمونه (نمونه تازه یا بلوک به همراه مشخصات آن)

[15] Equivocal
[16] Not interpretable

- فیکساتیو استفاده شده
- زمان فیکساسیون (در صورت اطلاع)
- مشخصات و نام روش مورد استفاده
- کفایت نمونه[17]
- نتیجه که باید شامل اطلاعات زیر باشد:
  - تعداد سلولهای شمارش شده
  - تعداد افراد مطالعه کننده
  - اشاره به پلی‌زومی و هتروژنسیتی در صورت وجود و توضیح تکمیلی در هر مورد
  - میانگین تعداد سیگنالهای HER2 به ازاء هر هسته
  - میانگین تعداد سیگنالهای CEP17 به ازاء هر هسته (در صورت استفاده از کنترل داخلی)
  - نسبت HER2/CEP17 (در صورت استفاده از کنترل داخلی)
  - تفسیرنهایی
- به صورت مثبت، نامشخص، منفی یا غیر قابل تفسیر

در صورتی که در طی کار به هر دلیلی IHC مجدداً انجام شود باید در گزارش نهایی ذکر گردد.

[17] Adequecy

نحوه تضمین کیفیت آزمایش HER2 FISH

1- صحه‌گذاری اولیه[18]

- هر آزمایشگاه متقاضی انجام HER-2 باید قبل از شروع آزمایش صحت کار خود را ارزیابی نماید.
- ارزیابی باید در برابر آزمایش مشابه FISH یا IHC که قبلا صحت آنها به اثبات رسیده است در همان آزمایشگاه یا آزمایشگاه دیگر انجام گیرد.
- صحه گذاری تشخیصی باید برای هر دو سری نتایج مثبت و منفی انجام شود که این کار با بررسی نتایج مربوط به 25 تا 100 نمونه با نتیجه مثبت قبلی و 25 تا 100 نمونه با نتیجه منفی قبلی انجام می‌شود.
- نتایج باید در هر دو گروه مثبت و منفی در بیش از 95% موارد با یکدیگر همخوانی داشته باشند. (Concordance> 95%)
- کلیه سوابق صحه گذاری اولیه باید ثبت و نگهداری شوند.
- ارائه دستورالعمل صحه گذاری و سوابق مربوط به انجام آنها جهت کسب مجوز آزمایش HER2 به روش FISH الزامی است.
- صحه گذاری باید به صورت سالیانه تجدید شود و مدارک آن نگهداری گردد.
- پس از ایجاد هر گونه تغییر در روند انجام آزمایش، شامل کلیه مراحل اعم از تغییر در نحوه فیکساسیون تا زمان تفسیر تست، صحه گذاری مجدداً باید صورت پذیرد

2- کنترل داخلی کیفیت

1- استفاده از کنترل های سه گانه (مثبت، منفی، نامشخص) در هر سری کاری و برای هر کیت جدید و ثبت نتایج آنها
2- کالیبر نمودن دستگاهها به خصوص میکروسکوپ فلورسانس
3- انجام اقدامات مربوط به کنترل و نگهداری دوره ای دستگاهها و ثبت سوابق
4- استفاده از لامهای استاندارد برای بررسی کیفیت میکروسکوپ فلورسانس و ثبت دوره ای نتایج
5- کنترل دما در مراحل مختلف هیبریدیزاسیون، شستشو و بعد از هیبریدیزاسیون و ثبت سوابق
6- وجود دماسنج کالیبره در آزمایشگاه با بازه دمایی $+/-1^{o}C$ برای کنترل دما

3- آزمون مهارت آزمایی (PT[19])

- هر آزمایشگاه که در آن آزمایش HER2 انجام می گیرد ، باید طبق ضوابط کشوری در آزمون شرکت نماید.

[18] Internal Validation
[19] Proficiency testing

- در هر آزمون PT تعداد مشخص نمونه مجهول مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که نتایج بدست آمده در آزمایشگاه باید در 90% موارد با نتایج مربوط به نمونه های ارسالی همخوانی داشته باشند.
- در صورت عدم رسیدن به حد نصاب 90% ، انجام آزمایش باید تا زمان اصلاح شرایط (بدنبال بازنگری در روشها و اصلاح روندکار) متوقف گردد. در این شرایط علل عدم انطباق رخ داده شده و شرح اقدامات اصلاحی باید ثبت گردد.

References

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Jan 1;25(1):118-45.

Vance GH, Barry TS, Bloom KJ. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer, panel summary and guidelines. Arch Pathol Lab Med 2009;133:161-2.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.Arch Pathol Lab Med. 2007;131(1):18-43.

Muller S, Matthiesen SH,Nielsen KV. Preparation of FFPE tissue slides for solid tumor FISH analysis. In: Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. California: Dako North America;2009. P.67-73.

Nielsen K V, Müller S, Poulsen TS, et al. Combined Use of PNA and DNA for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). In: Nielsen PE, eds.PEPTIDE NUCLEIC ACIDS — Protocols and Applications. 2nd Edition. Horizon Bioscience, 2004.

Osborn D. Filters for FISH imaging. In: Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. California: Dako North America;2009.p.75-80.

Kumar GL, Zucker RM. Fluorescece In Situ hybridization (FISH) imaging. Immunohistochemical Staining Methods Education Guide. California: Dako North America;2009.p.81-96.

NCCLS. Fluorescence in situ hybridization (FISH) method for medical genetics; Approved guidline. NCCLS document MM&-A.

Beatty BG, Mai S, Squire JA. FISH: a practical approach. Oxford University Press, USA: 2002.

Summary of ASCO/CAP HER2 Guideline Recommendations

Optimal algorithm for HER2 testing

Recommendation:

Positive for HER2 is either IHC HER2 3+ (defined as uniform intense membrane staining of > 30% of invasive tumor cells) or FISH amplified (ratio of *HER2* to CEP17 of >2.2 or average *HER2* gene copy number >six signals/nucleus for those test systems without an internal control probe).

Equivocal for HER2 is defined as either IHC 2+ or FISH ratio of 1.8–2.2 or average *HER2* gene copy number four to six signals/nucleus for test systems without an internal control probe.

Negative for HER2 is defined as either IHC 0-1+ or FISH ratio of <1.8 or average *HER2* gene copy number of <four signals/nucleus for test systems without an internal control probe.

Comments:

These definitions depend on laboratory documentation of the following:

1. Proof of initial testing validation in which position and negative HER2 categories are 95% concordant with alternative validated method
or same validated method for HER2.
2. Ongoing internal QA procedures.
3. Participation in external proficiency testing.
4. Current accreditation by valid accrediting agency.

Optimal FISH testing requirements

Recommendation:

Fixation for fewer than 6 hours or longer than 48 hours is not recommended.

Test is rejected and repeated if:

• Controls are not as expected.
• Observer cannot find and count at least two areas of invasive tumor.
• >25% of signals are unscorable due to weak signals.
• >10% of signals occur over cytoplasm.
• Nuclear resolution is poor.
• Autofluorescence is strong.

Interpretation done by counting at least 20 cells; a pathologist must confirm that counting involved invasive tumor.

Sample is subjected to increased counting and/or repeated if equivocal; report must include guideline-detailed elements.

Optimal IHC testing requirements

Recommendation:

Fixation for fewer than 6 hours or longer than 48 hours is not recommended.

Test is rejected and repeated or tested by FISH if:

• Controls are not as expected.
• Artifacts involve most of sample.
• Sample has strong membrane staining of normal breast ducts (internal controls).

Interpretation follows guideline recommendation.

• Positive HER2 result requires homogeneous, dark circumferential (chicken wire) pattern in >30% of invasive tumor.
• Interpreters have method to maintain consistency and competency.

Sample is subjected to confirmatory FISH testing if equivocal based on initial results.

Report must include guideline-detailed elements.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:18–43.

Optimal tissue handling requirements*

***Revised per the 2011 ASCO/CAP Clinical Notice on HER2 and ER/PgR**

Recommendation:

Time from tissue acquisition to fixation should be ≤ one hour; samples for HER2 testing are fixed in neutral buffered formalin (NBF) for 6–48 hours; samples should be sliced at 5–10mm intervals after appropriate gross inspection and margins designation and placed in sufficient volume of neutral buffered formalin. If tumor comes from remote location, it should be bisected through the tumor on removal and sent to the laboratory immersed in a sufficient volume of NBF. Cold ischemia time, fixative type, and time the sample was placed in NBF must be recorded.

Sections should ideally not be used for HER2 testing if cut > 6 weeks earlier; this may vary with primary fixation for storage conditions.

Time tissue is removed from patient, time tissue is placed in fixative, duration of fixation, and fixative type must be recorded and noted on accession slip or in report.

Optimal internal validation procedure

Recommendation:

Validation of test must be done before test is offered.

Initial test validation requires 25–100 samples tested by alternative validated method in the same laboratory or by validated method in another laboratory.

Proof of initial testing validation in which positive and negative HER2 categories are 95% concordant with alternative validated method or same validated method for HER2.

Ongoing validation should be done biannually.

Optimal internal QA procedures

Recommendation:

Initial test validation.

Ongoing quality control and equipment maintenance.

Initial and ongoing laboratory personnel training and competency assessment.

Use of standardized operating procedures including routine use of control materials.

Revalidation of procedure if changed.

Ongoing competency assessment and education of pathologists.

Optimal external proficiency assessment

Recommendation:

Participation in external proficiency testing programs with at least two testing events (mailings)/year.

Satisfactory performance requires at least 90% correct responses on graded challenges for either test.

• Unsatisfactory performance will require laboratory to respond according to accreditation agency program requirements.

Optimal laboratory accreditation

Recommendation:

Onsite inspection every other year with annual requirement for self-inspection.

• Reviews laboratory validation, procedures, QA results and processes, results and reports.

• Unsatisfactory performance results in suspension of laboratory testing for HER2 for that method.

Abbreviations: HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescent in situ hybridization; QA, quality assurance; NBF, neutral buffered formalin; ASCO, American Society of Clinical Oncology; CAP, College of American Pathologists