

Přehled výsledků z Referenční laboratoře

^{1,3}Hajdúch M, ^{1,3}Trojanec R, ^{2,3}Kolář Z, ^{1,3}Bouchalová K, ^{2,3}Sedláková E.

¹ Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

² Laboratoř molekulární patologie při Ústavu patologie LF UP a FN Olomouc

³ Referenční laboratoř pro c-erbB-2, LF UP v Olomouci

Přehled dosavadních zkušeností a problémů

Detekované neshody mezi RL a LLs >1 nebo >2 IHC stupně, v průběhu existence RL

Neshod a RL vs.LLs.	0-6 měs. (%)	7-12 měs. (%)	13-18 měs. (%)	19-24 měs. (%)	25-30 měs. (%)	31-36 měs. (%)	37-42 měs. (%)	43-47 měs. (%)	0-47 měs. (%)
>2 IHC	14,08	19,51	12,59	19,33	31,52	30,28	22,10	35,29	21,76
>1 IHC	28,17	43,90	37,04	40,34	50,00	44,95	40,00	52,94	41,06



Shoda mezi centrální IHC a centrální FISH

Měsíce činnosti	FISH	IMMUNOHISTOCHEMIE			
		3+	2+	1+	0
0-6	FISH +	40/42 (95,2%)	3/9 (33,3%)	3/14 (21,4%)	2/8 (25%)
	FISH -	2/42 (4,8%)	6/9 (66,6%)	11/14 (78,6%)	6/8 (75%)
	POLYSOMIE	1/42 (2,3%)	0	1/14 (7,14%)	0
	SHODA	95,52%	33,3%	78,6%	75%
7-12	FISH +	49/49 (100%)	5/12 (41,7%)	4/17 (23,5%)	2/30 (6,7%)
	FISH -	0	7/12 (58,3%)	13/17 (76,4%)	28/30 (93,3%)
	POLYSOMIE	0	1/12 (8,3%)	2/17 (11,76%)	0
	SHODA	100%	41,7%	76,4%	93,3%
13-18	FISH +	88/90 (97,8%)	14/14 (100%)	8/34 (23,5%)	3/28 (10,7%)
	FISH -	2/90 (2,22%)	0	26/34 (76,5%)	25/28 (89,3%)
	POLYSOMIE	3/90 (3,3%)	0	1/34 (2,9%)	0
	SHODA	97,8%	100%	76,5%	89,3%
19-24	FISH +	77/78 (98,7%)	10/12 (83,3%)	9/28 (32,1%)	5/40 (12,5%)
	FISH -	1/78 (1,3%)	2/12 (16,6%)	19/28 (67,9%)	35/40 (87,5%)
	POLYSOMIE	11/78 (14,1%)	2/12 (16,6%)	1/28 (3,6%)	1/40 (2,5%)
	SHODA	98,7%	83,3%	67,9%	87,5%
25-30	FISH +	55/55 (100%)	7/7 (100%)	4/10 (40%)	2/42 (4,76%)
	FISH -	0	0	6/10 (60%)	40/42 (95,2%)
	POLYSOMIE	6/55 (10,9%)	2/7 (28,6%)	2/10 (20%)	7/42 (16,6%)
	SHODA	100%	100%	60,0%	95,2%
31-36	FISH +	63/67 (94,0%)	5/13 (38,5%)	4/10 (40,0%)	9/49 (18,4%)
	FISH -	4/67 (6,0%)	1/13 (7,7%)	6/10 (60,0%)	40/49 (81,6%)
	POLYSOMIE	4/67 (6,0%)	2/13 (15,4%)	2/10 (20,0%)	5/49 (10,2%)
	SHODA	94,0%	38,5%	60,0%	81,4%



Shoda mezi centrální IHC a centrální FISH: SOUHRN

Měsíce činnosti	FISH	IMMUNOHISTOCHEMIE			
		3+	2+	1+	0
37-42	FISH +	62/62 (100%)	5/5 (100%)	6/14 (42,9%)	5/39 (12,8%)
	FISH -	0/62 (0%)	0/5 (0%)	8/14 (57,1%)	34/39 (87,2%)
	POLYSOMIE	10/62 (16,1%)	1/5 (20%)	1/14 (7,1%)	3/39 (7,7%)
	SHODA	100%	100%	57,1%	87,2%
43-47	FISH +	36/36 (100%)	6/9 (66,6%)	1/4 (25,0%)	5/29 (17,24%)
	FISH -	0/36 (0%)	3/9 (33,3%)	3/4 (75,0%)	24/29 (82,8%)
	POLYSOMIE	1/36 (2,8%)	0/9 (0%)	0/4 (0%)	0/29 (0%)
	SHODA	100%	66,6%	75,0%	82,8%
0-47	FISH +	476/40 (98,1%)	61/81 (75,3%)	42/133 (31,6%)	31/260 (11,9%)
	FISH -	9/485 (1,9%)	20/81 (24,7%)	91/133 (68,4%)	229/260 (88,1%)
	POLYSOMIE	52/485 (10,7%)	13/81 (16,1%)	23/133 (17,3%)	21/260 (8,1%)
	SHODA	98,1%	75,3%	68,4%	88,1%

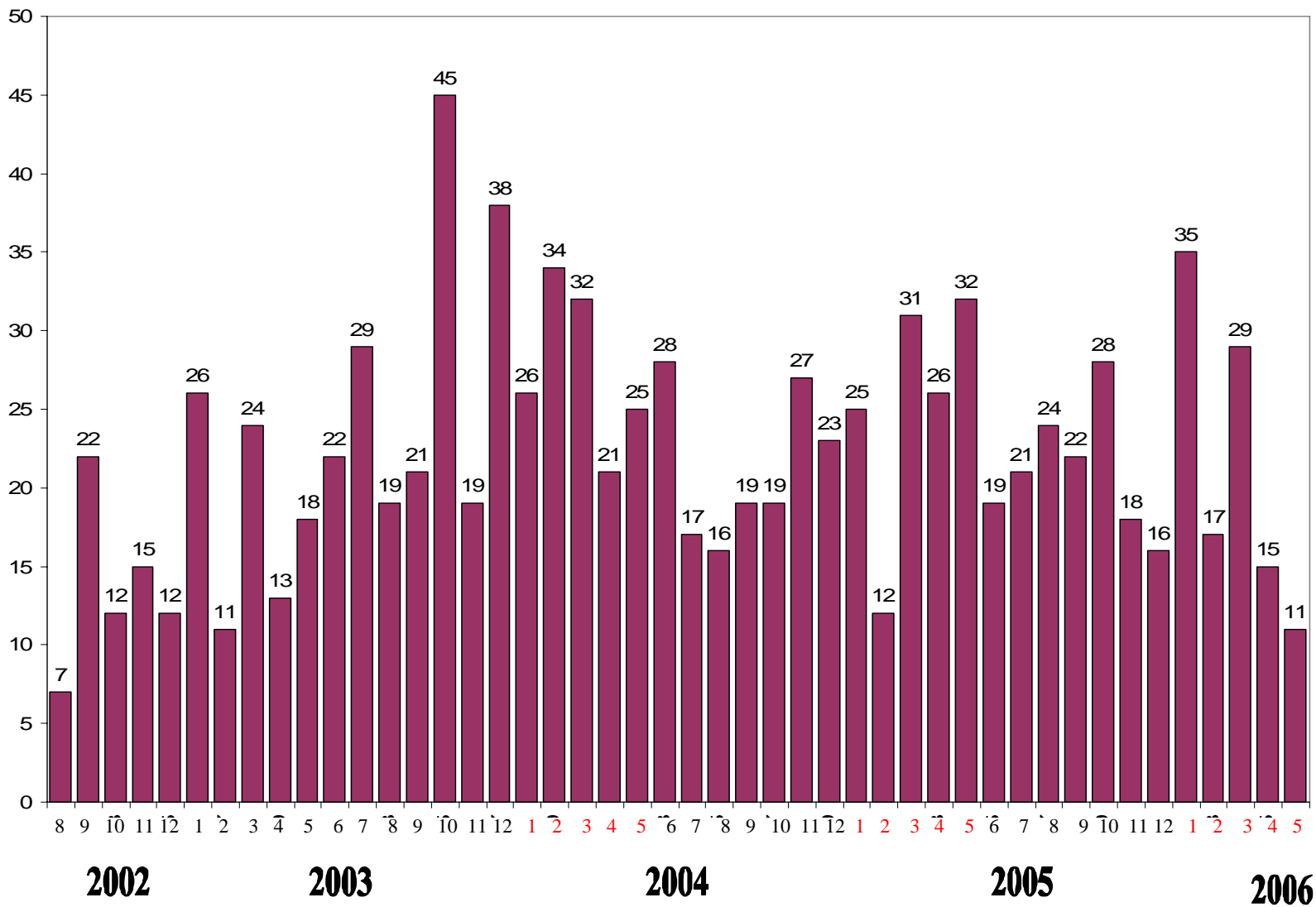


Shoda FISH mezi lokálními (LL) a referenční (RL) laboratoří (data ze 3-4 laboratoří).

Měsíce činnosti RL	Počet pacientek	Shoda (%) / počet
0-6	1	100,00 (1/1)
7-12	14	71,40 (10/14)
13-18	13	100,00 (13/13)
19-24	9	100,00 (9/9)
25-30	10	90,00 (9/10)
31-36	9	100,00 (9/9)
37-42	8	87,50 (7/8)
43-47	5	100,00 (5/5)
0-47	63	93,61 (63/69)



Počty vyšetřených pacientek v RL





Provyšetřenost a vyšetřitelnost vzorků v LL a RL

		výsledky z LL			
měsíce	počet vzorků	IHC vyšetřeno (%)	IHC nevyšetřeno (%)	FISH vyšetřeno (%)	FISH nevyšetřeno (%)
0-6	90	79	21	1,11	98,89
7-12	113	73	27	12,40	87,60
13-18	172	78	22	7,56	92,44
19-24	166	72	28	5,42	94,58
25-30	121	76	24	8,20	91,80
31-36	147	74	26	6,12	93,88
37-42	129	74	26	6,20	93,80
43-47	88	77	23	5,68	94,32
0-47	1026	75	25	6,59	93,41
		vyšetřitelnost IHC/FISH v RL			
měsíce	počet vzorků	nelze IHC (%)	nelze FISH (%)		
0-6	90	16	2		
7-12	113	0	2		
13-18	172	1	3		
19-24	166	1	4		
25-30	121	2	5		
31-36	147	2	5		
37-42	129	4	5		
43-47	88	0	10		
0-47	1026	3	4		

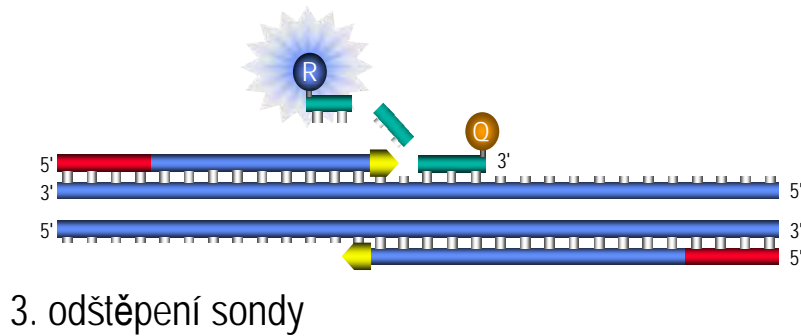
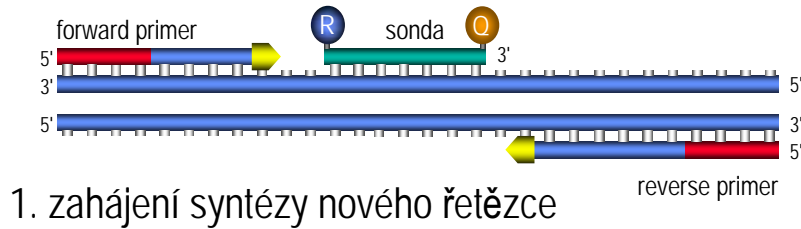


Detekce amplifikace *her2/neu* genu metodou RQ-PCR

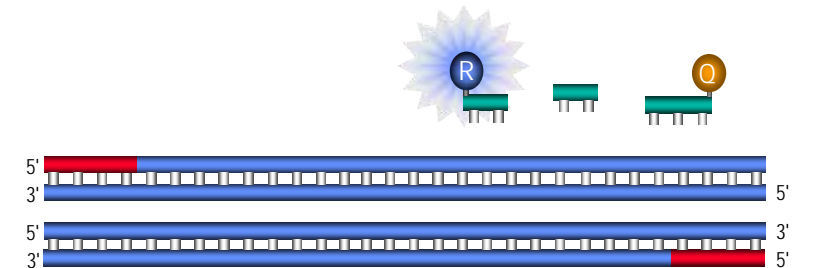
Berkovcová J., Trojanec R., Radová L.,
Hajdúch M.



RQ-PCR s TaqMan sondou



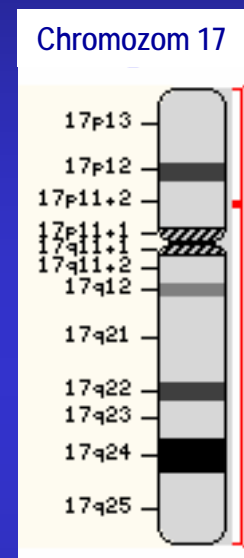
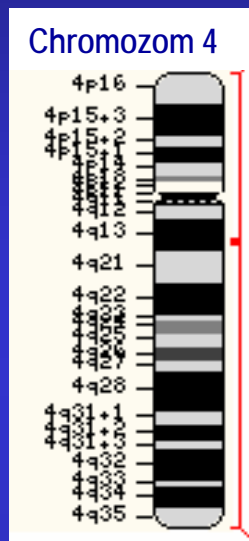
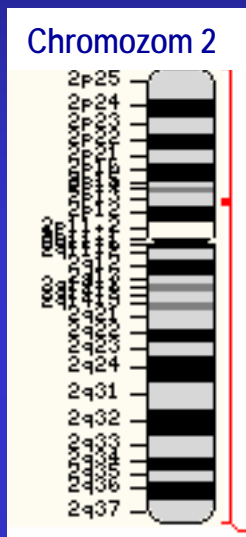
R = reporter dye
Q = quencher dye



4. syntéza kompletní



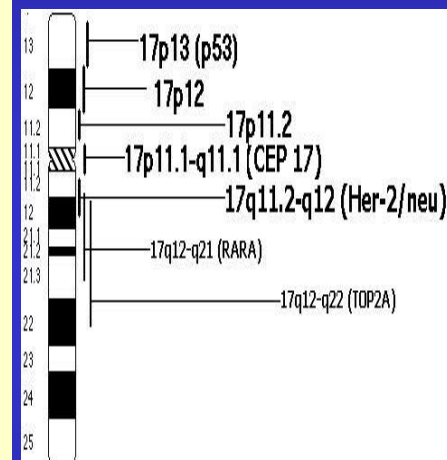
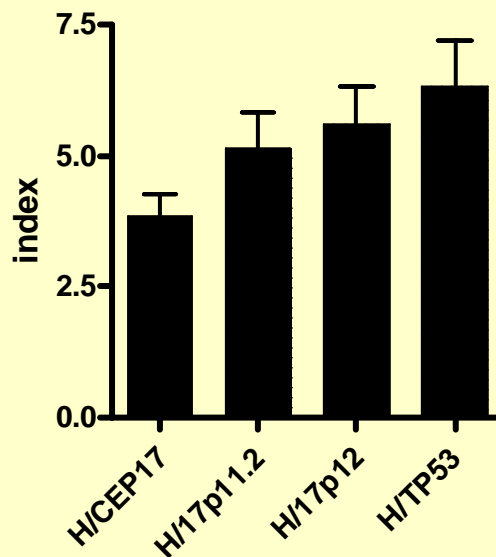
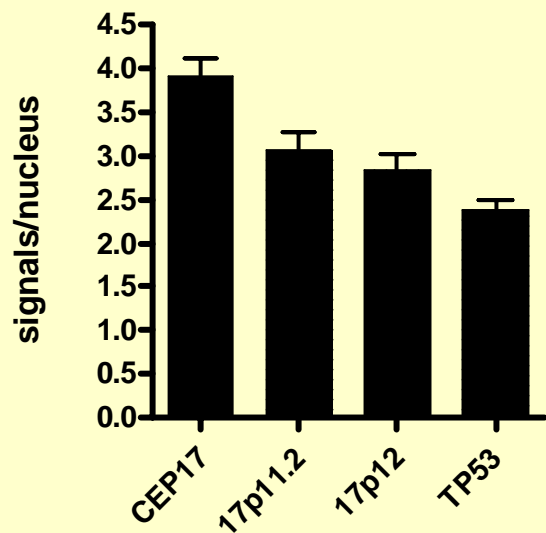
Referenční geny



- Duplexní RQ-PCR ... detekce referenčního genu v 1 reakci s genem *her2/neu*
- Referenční geny ...
 - gsc1 – na chromozomu 2
 - dck – na chromozomu 4
 - epn2 – na chromozomu 17



Mapování počtu kopií CH17 s použitím dalších sond u nádorů polyzomických v CEP17





Duplexní RQ-PCR

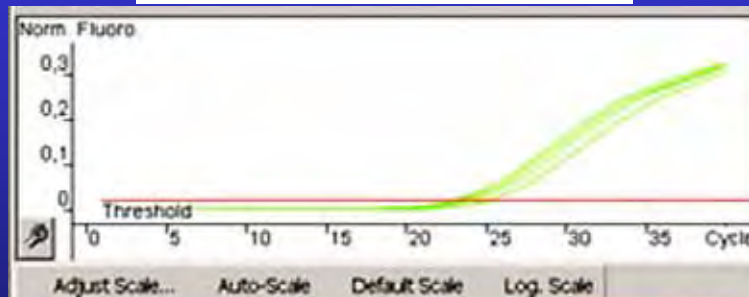


Rotor Gene 3000 (Corbett-Research)

... rozlišení fluorescence o různých vlnových délkách

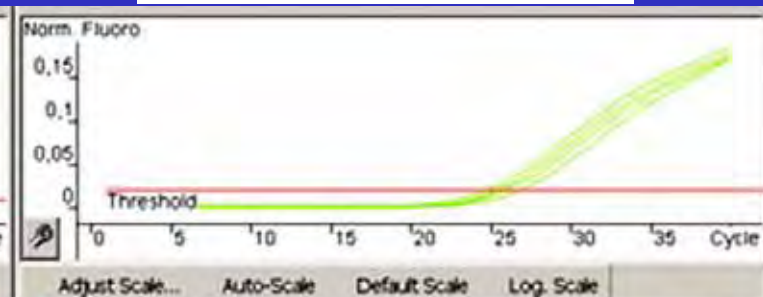
- Proba *her2/neu* ... BHQ1-FAM
- Proba referenčního genu ... BHQ1-HEX

RQ-PCR *her/neu2*



No.	Name	Type	Ct	Given Conc (copi)	Calc Conc (copie)
21	20ng	Standard	25.31	6 660	6 500
23	40ng	Standard	24.18	13 320	13 740
25	60ng	Standard	23.55	19 980	20 845
27	80ng	Standard	23.25	26 640	25 363

RQ-PCR *epn2*



No.	Name	Type	Ct	Given Conc (copi)	Calc Conc (copie)
21	20ng	Standard	26.96	6 660	6 887
23	40ng	Standard	26.05	13 320	12 852
25	60ng	Standard	25.51	19 980	18 537
27	80ng	Standard	24.86	26 640	28 781



Teoretické stanovení citlivosti metody

$$K > \frac{n \cdot \ln 2}{\ln 2x}$$

... K ~ počet nádorových buněk

... n ~ celkový počet buněk v reakci

... x ~ počet kopií *her2* genu v buňce

Výsledně:

3 kopie *her2* genu \Rightarrow 30% pozitivní DNA

20 kopií *her2* genu \Rightarrow 20% pozitivní DNA



Stanovení citlivosti metody RQ-PCR

Vyšetření pozitivní buněčné linie CALU3

(> 20 kopií genu *her2/neu* v buňce)

- ředění pozitivních buněk negativními → izolace DNA z 10^6 buněk → vyšetření z 50ng DNA (~ cca 8400 buněk/reakci)

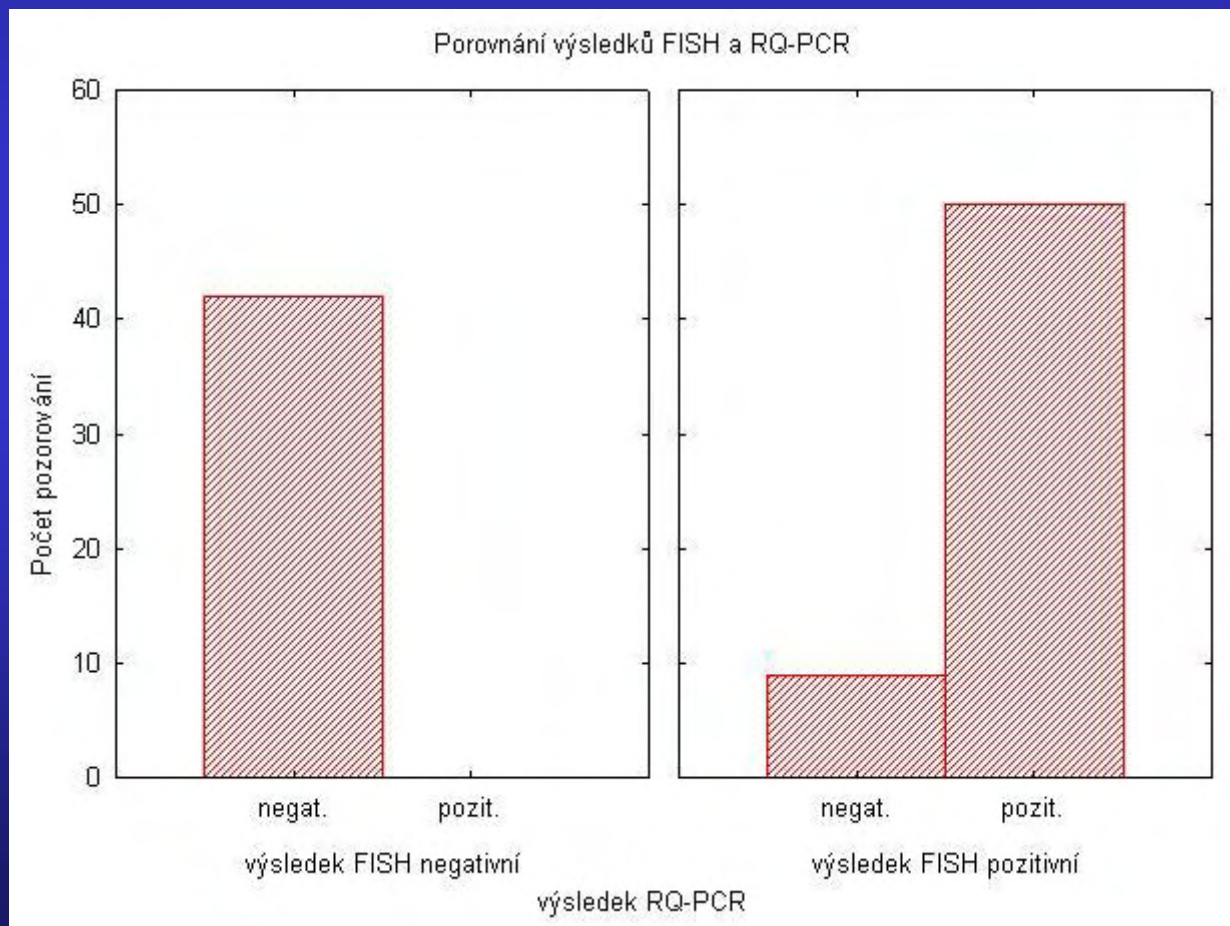
vzorek	kopie her2	poměr
10^0 z 10^6	7891	0,96
10^1 z 10^6	7947	1,06
10^2 z 10^6	6073	0,99
10^3 z 10^6	8075	1,35
10^4 z 10^6	10690	1,67
10^5 z 10^6	34936	4,92
10^6 z 10^6	331941	23,04

Závěr:

- Hraniční hodnoty ... od 1% pozitivní DNA
- Pozitivita ... od 10% pozitivní DNA



Porovnání vyšetření tkáňových preparátů metodou FISH a RQ-PCR



➤ celkem paralelně vyšetřeno 125 pacientek

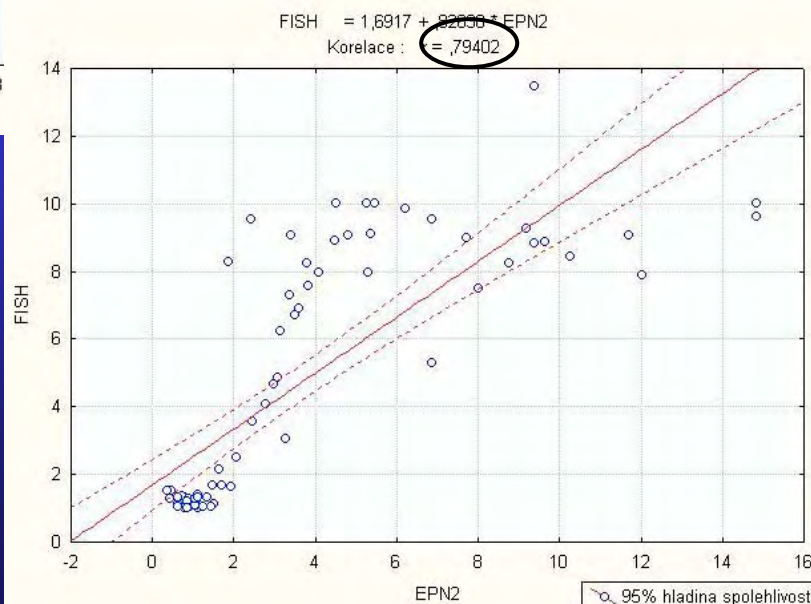
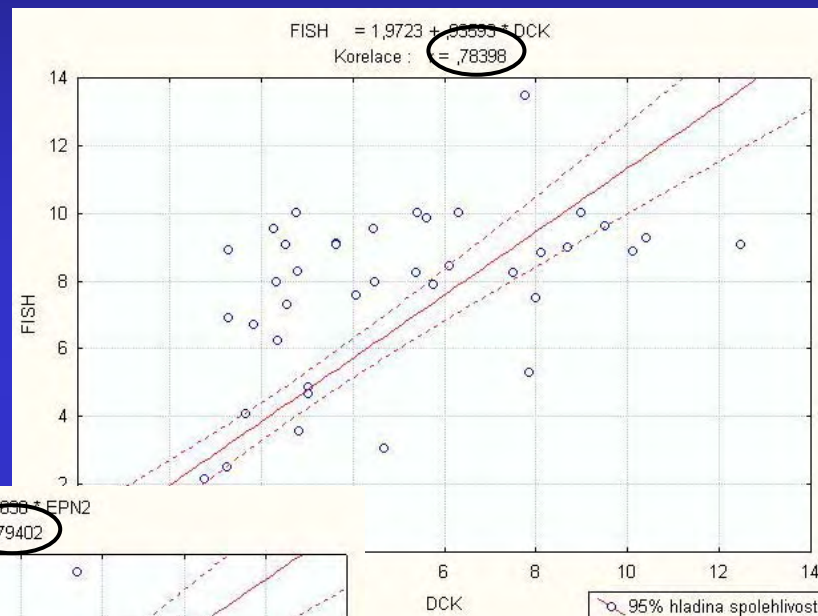
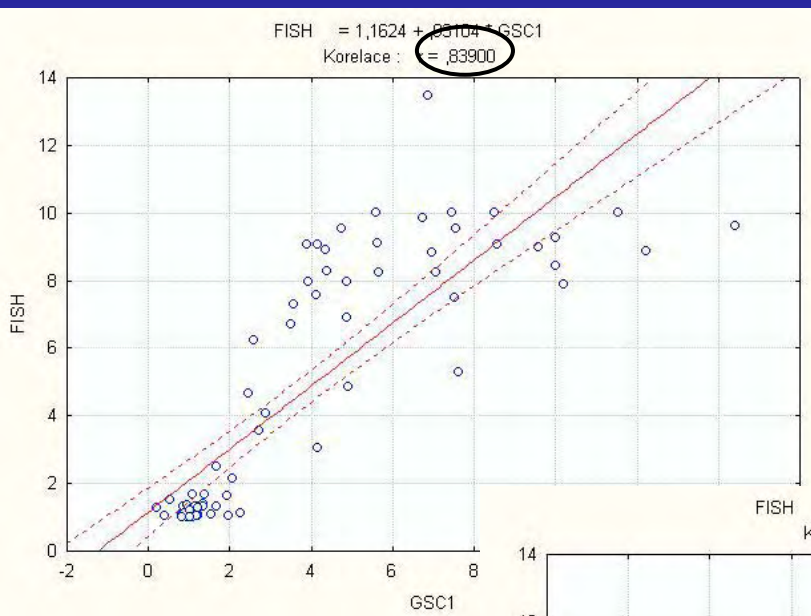
➤ shoda v 91%

➤ v 9% chybně zhodnocen pozitivní výsledek FISH jako negativní RQ-PCR

(v 50% případů detekovaná **polyzomie** metodou RQ-PCR)



Korelace jednotlivých RQ-PCR s FISH





Rozšíření vyšetřitelnosti vzorků

	FISH	IHC	GSC1	DCK	EPN2	závěr RQ-PCR
1	nelze	0	1,16	0,33	0,68	negativní
2	nelze	1+	nelze			
3	nelze	0	0,93	0,29	0,68	negativní
4	nelze	1+	nelze			
5	nelze	0	1,48	1,43	nelze	negativní
6	nelze	0	1,78	0,34	1,27	negativní
7	nelze	0	0,81	0,62	0,91	negativní
8	nelze	3+	5,58	2,6	3,34	pozitivní
9	nelze	0	1,05	0,38	0,75	negativní
10	nelze	0	nelze			
11	nelze	1+	1,38	1,15	nelze	negativní

➔ Možné vyšetřit dalších téměř 75% pacientek, u kterých nelze výsledek amplifikace genu *her2/neu* stanovit metodou FISH.



Jak dál v testování Her-2?

- chybovost vyšetření v IHC zůstává dlouhodobě stabilní, přes 20% vzorků se liší o více než 2 IHC stupně → zachování druhého čtení!
- riziko falešně negativních vzorků v primárním screeningu, tyto pacientky vypadnou z indikačních kritérií → potřeba zavedení systému externí kontroly kvality!
- vysoká shoda ve vyšetření FISH - pravděpodobně daná malým počtem vyšetřujících center (zkušenost z CAP)
- část vzorků je špatně fixovaná a neumožňují provedení FISH, částečně řešeno novou technikou RQ-PCR → standardizace odběrových a fixačních postupů



Jak dál s Referenční laboratoří?

- Předpokládané zvýšení indikace trastuzumabu s jeho zavedením do adjuvance je s ohledem na platbu z paušálu málo pravděpodobné, reálně dochází k omezení indikace vyšetření až o 40-50% → zachování stávajícího stavu do vyřešení způsobu financování
- Po reálném zavedení léčiva do adjuvance předpokládáme nárůst počtu vyšetření 2-3x → je třeba řešit nárůst a kvalitu primární i konfirmační diagnostiky.
- Konfirmační diagnostika:
 - Systém dvou akreditovaných referenčních laboratoří
 - Jedna akreditovaná referenční laboratoř provádějící dohled nad kvalitou vyšetření systémem externí kontroly kvality na základě kterého budou certifikovány lokální pracoviště
- Řešení úhrady konfirmačního vyšetření v systému zdravotního pojištění