



Vážení čtenáři, metodika in situ hybridizace s detekcí stříbrem (SISH), kterou provozujeme v rutinní histopatologické diagnostice laboratoří molekulární patologie, byla v uplynulém roce optimalizována. V následujícím textu vás chceme stručně informovat o změnách, ke kterým došlo.

Optimalizovaná metoda Dual ISH v detekci amplifikace genu *ERBB2* u karcinomu prsu a žaludku

MUDr. TOMÁŠ ROZKOŠ, Ph.D.

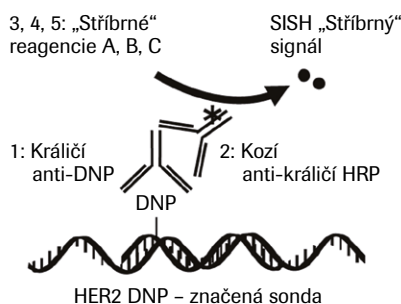
Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod

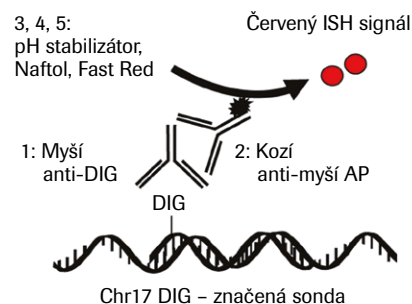
Přesně před rokem vyšel na stránkách tohoto časopisu článek „Využití in situ hybridizace s detekcí stříbrem (SISH) v rutinní histopatologické diagnostice

v laboratořích molekulární patologie“. Článek popisoval metodu a její porovnání s fluorescenční in situ hybridizací. Velká část byla věnována také úskalí preanalytické a analytické fáze vyšetřování případné amplifikace genu *ERBB2* (kódujícího protein HER2) u karcinomu prsu a žaludku metodou Dual ISH. Od té doby došlo k úpravě a vylepšení sondy i detekčního postupu, o kterém bychom vás rádi informovali společně s názornými ukázkami a statistikami. Princip metody samotné a typy preanalytických i analytických chyb zůstávají a byly popsány ve zmíněném loňském článku, zde zazní pouze novinky.

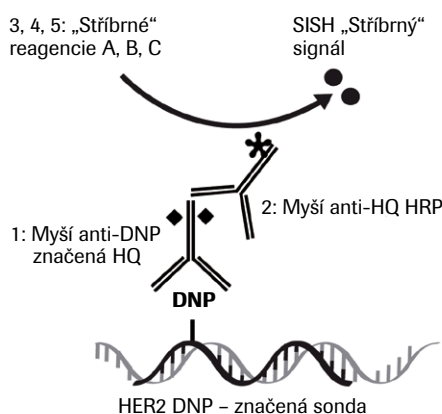
A. HER2 DNP – značená sonda a INFORM Silver ISH DNP detekční kit



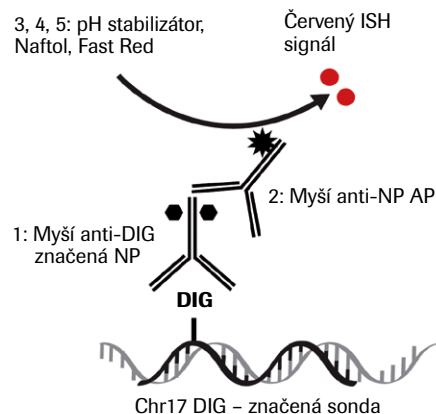
B. Chr17 DIG – značená sonda a INFORM Red ISH DIG detekční kit



A. HER2 DNP – značená sonda a VENTANA Silver ISH DNP detekční kit



B. Chr17 DIG – značená sonda a VENTANA Red ISH DIG detekční kit



DNP – dinitrofenol, DIG – digoxigenin, HRP – křenová peroxidáza, AP – alkalická fosfatáza, HQ – hydroxychinoxalin, NP – nitropyrazol

▲ Schéma původního (nahore) a nového (dole) detekčního postupu

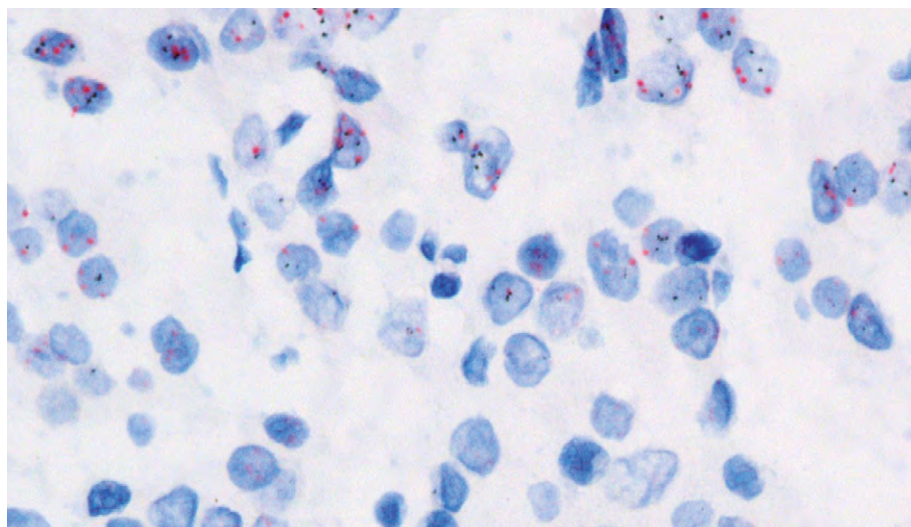


Popis jednotlivých vylepšení postupu a jejich významu

První změnou, kterou výrobce provedl, bylo zkrácení délky hybridizačních sond na tzv. oligonukleotidové sondy. Tento krok pomáhá zejména snížit výskyt pre-analytických chyb, tedy těch, které se vyskytly v důsledku nekvalitní tkáně, což je v případě in situ hybridizace tkáň s příliš fragmentovanou DNA. Nejčastější příčinou degradace/fragmentace DNA je příliš dlouhá doba fixace tkáně ve formalínu (zpravidla doba přesahující 96 hodin). Zkrácení sond tak alespoň v části takových případů umožňuje provést úspěšnou hybridizaci navázáním kratší sondy na příslušné fragmenty DNA. Úspěšnost je samozřejmě závislá na stupni poškození/fragmentace DNA.

Druhou provedenou změnou bylo přidání syntetických vazebných molekul (haptenu) nitropyrazol (NP) a hydroxychinolalin (HQ) do detekčního postupu jednotlivých sond (viz schéma původní a nové detekce). Vazba primární a sekundární protilátky zprostředkovaná syntetickou molekulou je oproti užití protilátek od dvou různých zvířecích druhů specifičtější. Tato změna pomáhá snížit výskyt analytických chyb spojených s nespecifickým pozadím či slabou intenzitou signálů.

Konečně třetí provedenou změnou je úprava velikosti balení reagensů. Dříve byla dodávána sonda v množství na provedení 50 testů a detekční reagensie na 100 testů. V novém postupu byla velikost balení snížena na objem 30 testů u sondy a 60 testů u detekčních reagensů. Ačkoliv se nejedná o technologické zlepšení, má i toto opatření svůj přínos. Jedním z problémů analytické fáze je totiž „stárnutí“ sondy v důsledku jejího opětovného transportu mezi uskladněním v chladicím boxu a mezi automatem, ve kterém probíhá detekce. Zejména na pracovištích, ve kterých se neprovádí velké počty vyšetření, pak



▲ Obr. č. 1

může docházet k analytickým chybám právě v důsledku degradace sondy. Zmenšení objemu sondy (a tedy počtu vyšetření provedených z jednoho balení) tak napomáhá odstranit tuto podskupinu analytických chyb.

Porovnání původního a nového postupu

V průběhu září 2019 byl na našem pracovišti (Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové) testován konsekutivně a prospektivně souběžně původní a nový postup Dual ISH detekce amplifikace genu *ERBB2* u karcinomu prsu a žaludku. Celkem bylo souběžně otestováno 13 případů karcinomu prsu a jeden karcinomu žaludku, přičemž ve všech případech byly výsledky detekce novým postupem buď stejné, nebo lepší ve srovnání s původní metodou. Následně jsme ještě novou metodou otestovali šest starších případů, u kterých se původním postupem nepodařilo dosáhnout hodnotitelného výsledku. Z těchto šesti případů byly novou metodou čtyři případy plně hodnotitelné, jeden případ byl technicky limitován, nicméně by umožňoval uvolnit diagnostický závěr, a u jednoho případu se nepodařilo dosáhnout hodnotitelného výsledku ani novým postupem. V testování

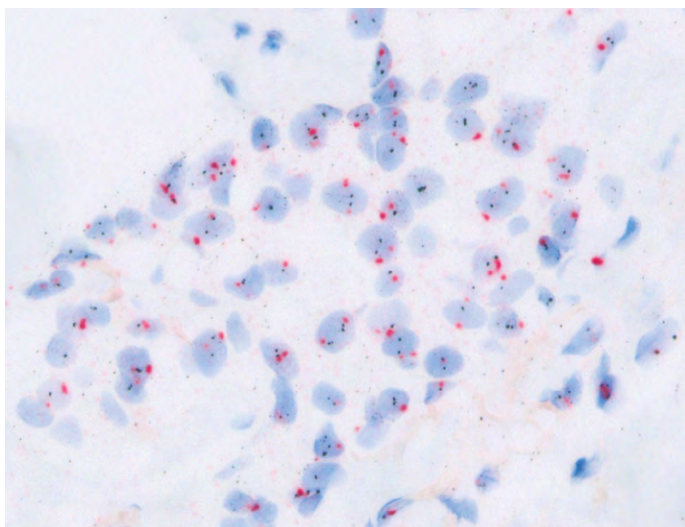
novou metodou jsme pozorovali v tomto období pouze jednu analytickou chybu, a to absenci signálů v části vyšetřované tkáně (obr. č. 1), nicméně tato „vada“ v žádném z případů nevedla k nemožnosti hodnotit výsledek, neboť vždy byla přítomna nádorová tkáň s řádnou detekcí. Pro lepší představu o komparaci obou postupů dále uvádíme popisy několika porovnávaných případů i s mikrofotografiemi.

Případ č. 1

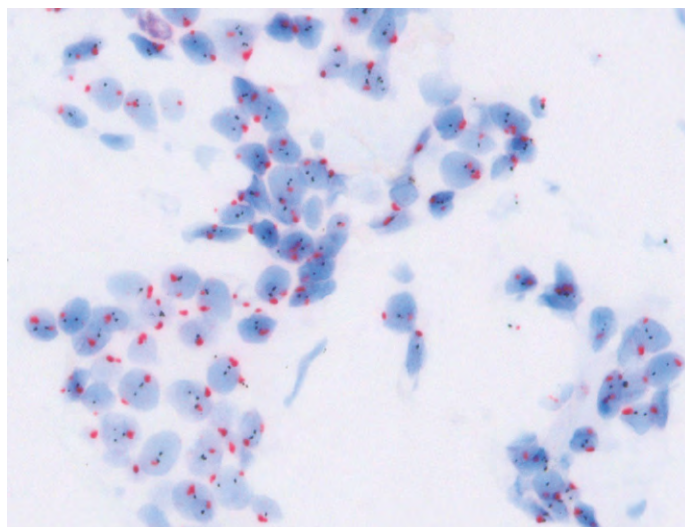
Karcinom prsu, u něhož byla detekce původním (obr. č. 2a) i novým (obr. č. 2b) postupem hodnotitelná, nicméně při porovnání je vidět lepší kvalita nového postupu, jednotlivé červené i černé signály jsou jasnější a ostřejší a pozadí je „čistší“ v porovnání s detekcí původním postupem.

Případ č. 2

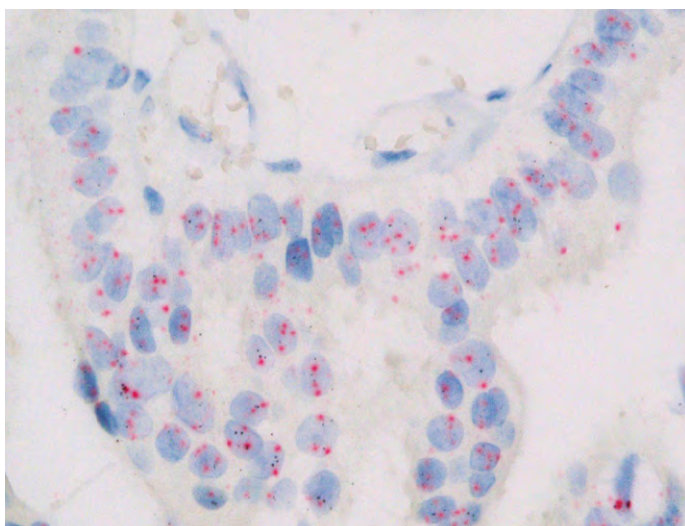
Karcinom prsu, u něhož jsme opakovaně starým postupem detekovali černé signály pouze velmi slabé intenzity (obr. č. 3a), případ tak nebylo možné spolehlivě posoudit. Novým postupem byla intenzita obou barevných signálů vyšší a případ bylo možné hodnotit (obr. č. 3b).



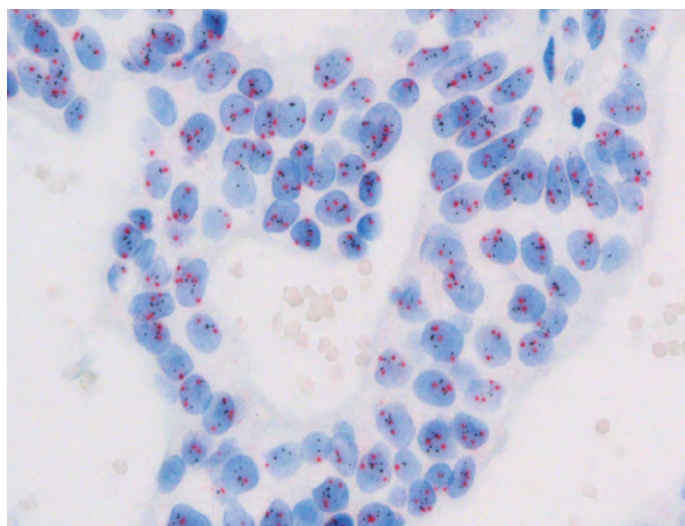
▲ Obr. č. 2a



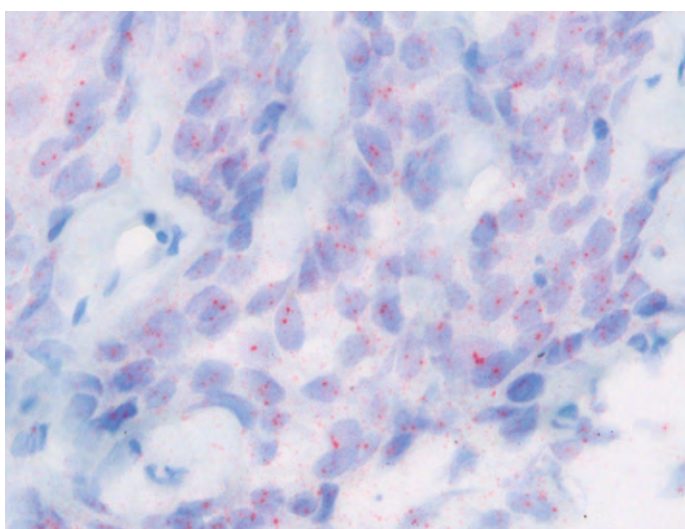
▲ Obr. č. 2b



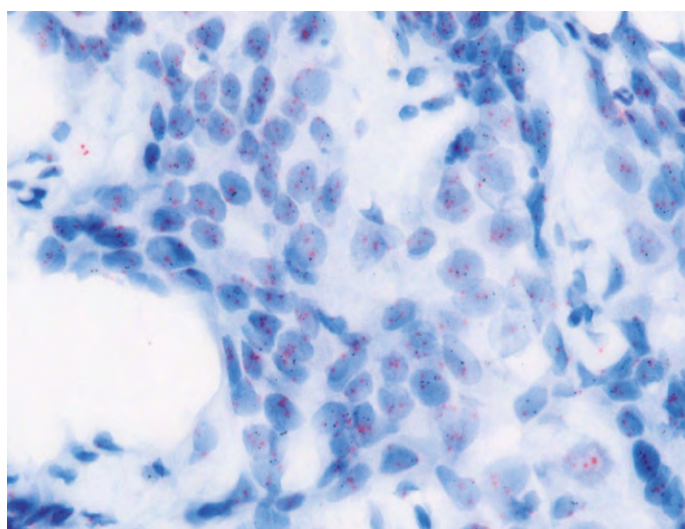
▲ Obr. č. 3a



▲ Obr. č. 3b



▲ Obr. č. 4a



▲ Obr. č. 4b



Případ č. 3

Karcinom prsu, kdy byly původně zastíže-ny pouze rozpité červené signály s nespecifickým pozadím a úplnou absencí černých signálů, případ tedy nebylo možné hodnotit (obr. č. 4a). Novým postupem jsou přítomny signály obou barev, byť jsou černé signály drobnější, lze je spolehlivě identifikovat, a tudíž hodnotit (obr. č. 4b).

Případ č. 4

Karcinom prsu – původním způsobem je ve tkáni přítomno velké množství

nespecifických černých signálů i mimo jádra buněk (tzv. speckling), případ tedy nelze hodnotit (obr. č. 5a). Novým postupem je detekce v pořádku, bez nespecifického pozadí (obr. č. 5b).

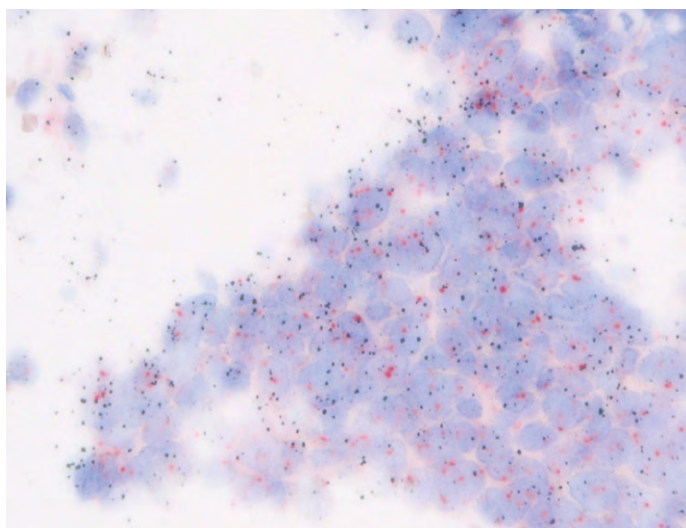
Případ č. 5

Karcinom prsu, u kterého nebyly opakovaně detekovány žádné signály původním postupem (obr. č. 6a). Pátráním po údajích o vzorku (konzultační materiál z jiného pracoviště) bylo zjištěno, že tkáň byla fixována cca 90 hodin, a tudíž může být poškozena příliš dlouhou

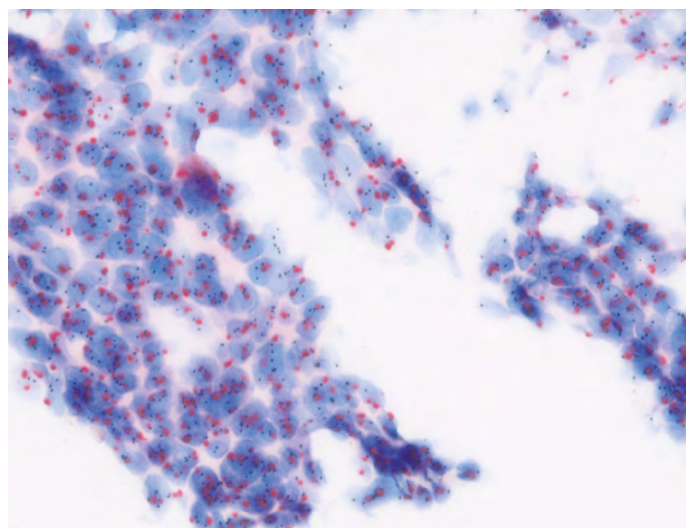
fixací. Vyšetření novým postupem však ještě dokázalo částečně fragmentovanou DNA detekovat (dobře patrné černé signály genu *ERBB2* a v některých jádrech i červené signály chromozomu 17 viz obr. č. 6b).

Případ č. 6

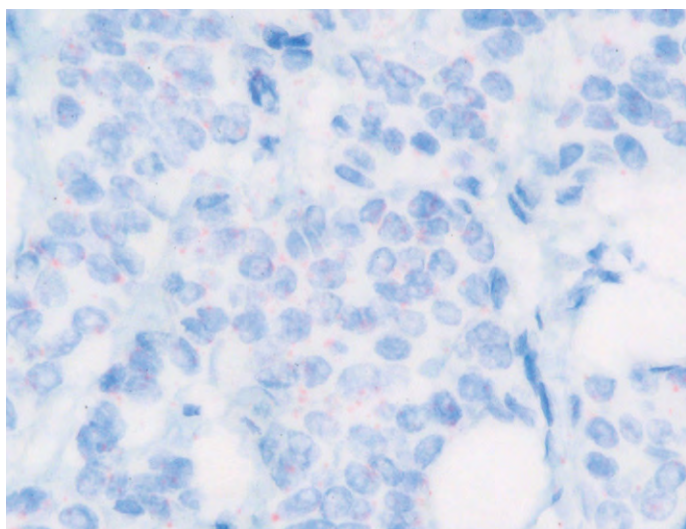
Karcinom prsu s velmi obdobným nálezem jako v předchozím případě (obr. č. 7a). Původní metodou se nepodařilo identifikovat signály a následným pátráním bylo zjištěno, že tkáň byla fixována sedm dní! DNA tedy byla velmi



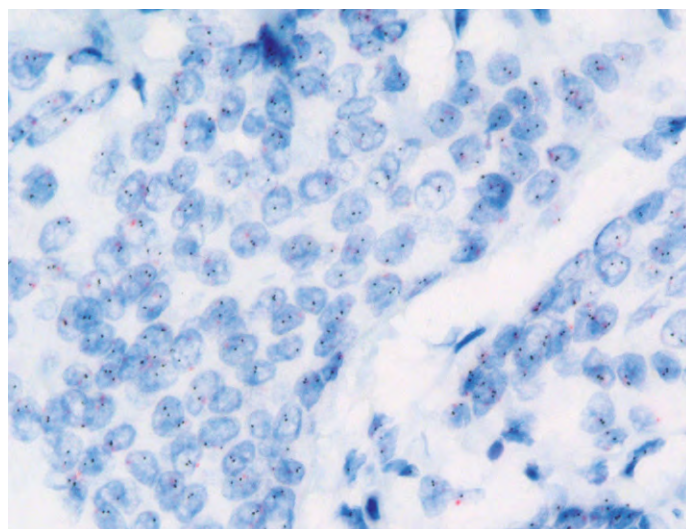
▲ Obr. č. 5a



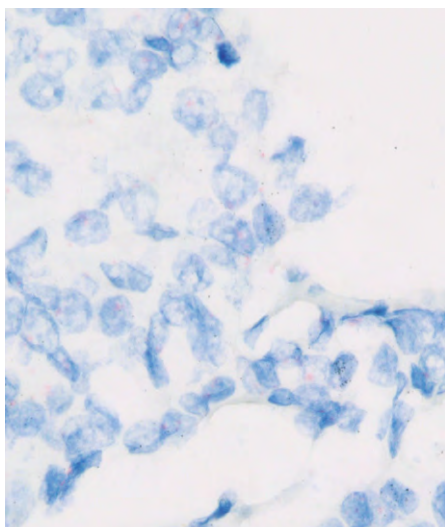
▲ Obr. č. 5b



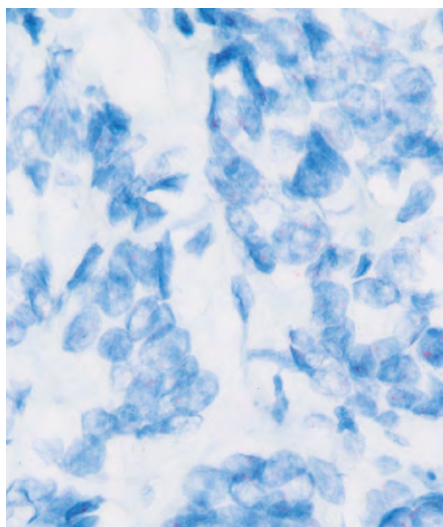
▲ Obr. č. 6a



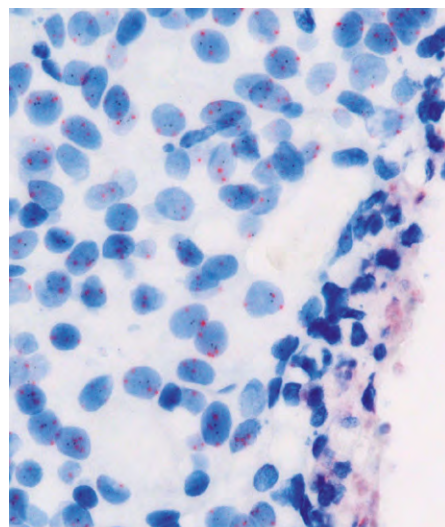
▲ Obr. č. 6b



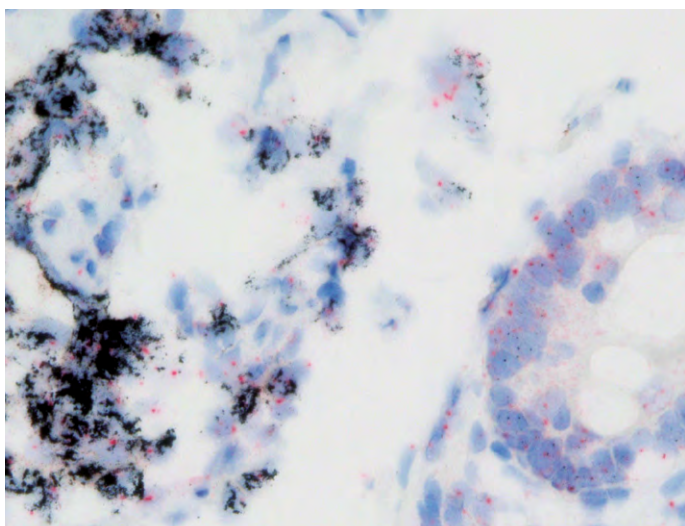
▲ Obr. č. 7a



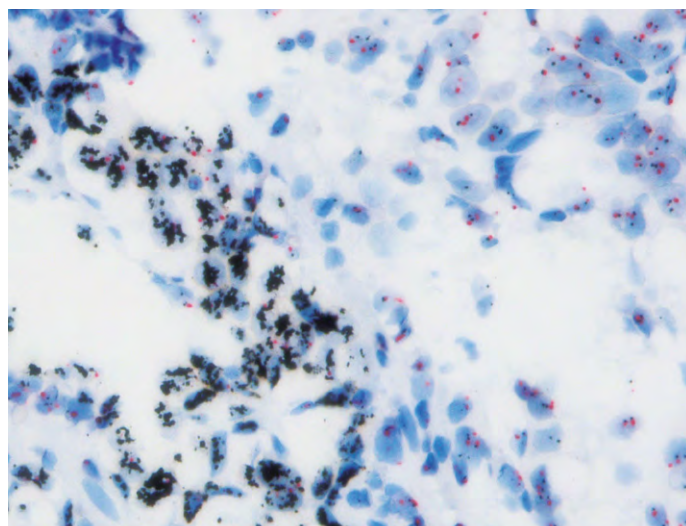
▲ Obr. č. 7b



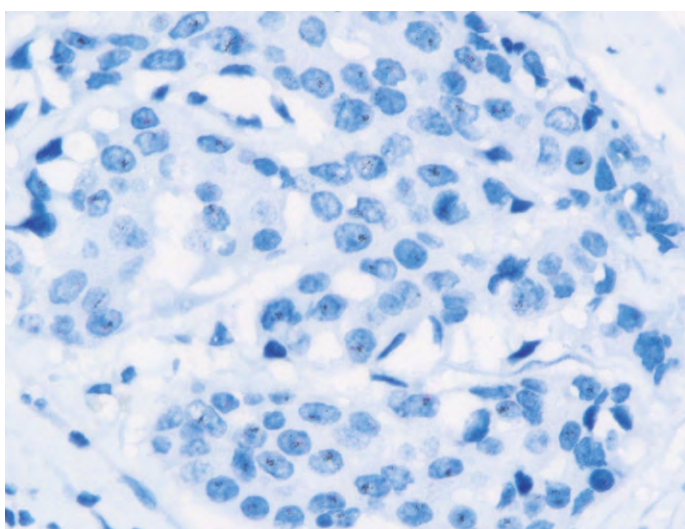
▲ Obr. č. 7c



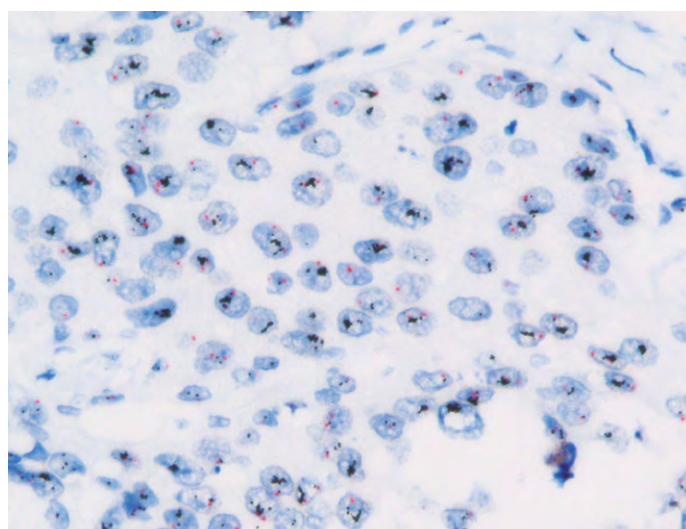
▲ Obr. č. 8a



▲ Obr. č. 8b



▲ Obr. č. 9



▲ Obr. č. 10



poškozená a ani novým postupem se v invazivním nádoru nepodařilo prokázat signály (obr. č. 7b). Za částečný úspěch lze považovat alespoň průkaz specifických signálů obou barev v in situ složce tumoru (obr. č. 7c), nicméně celkově se z daného materiálu nešlo k amplifikaci vyjádřit. Tkáň byla až příliš poškozená.

Případ č. 7

Karcinom žaludku, imunohistochemicky se silnou expresí proteinu HER2 (3+) a v minulosti Dual ISH hodnocen jako amplifikovaný s tvorbou tzv. clusterů signálů (obr. č. 8a). Nová metoda potvrdila původní závěr, nicméně v nenádorové tkáni je vidět mnohem lepší detekce signálů v porovnání s dřívějším vyšetřením (obr. č. 8b). Nová metoda je tedy stejně úspěšná i u karcinomu žaludku.

Statistické porovnání metod

Jelikož se nám nová metoda v přímém porovnání osvědčila, začali jsme

	Původní metoda	Nová metoda
Vyšetřených případů	310 (leden–září)	137 (říjen–prosinec)
Opakováno celkem (%)	41 (13,2 %)	5 (3,7 %)
Preanalytické chyby (%) / NDG (%)	15 (4,8 %) / 8 (2,6 %)	2 (1,5 %) / 2 (1,5 %)
Analytické chyby (%) / NDG (%)	26 (8,4 %) / 0	3 (2,2 %) / 0

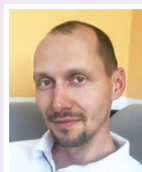
▲ Tab. č. 1: Statistika opakovaných vyšetření v roce 2019

na našem pracovišti od října 2019 testovat veškeré případy na amplifikaci genu *ERBB2* již pouze novou metodou. V období říjen–prosinec 2019 se v testovaných případech celkem 2x objevily nedidiagnostické vzorky s preanalytickou chybou a celkem 3x se vyskytla analytická chyba v podobě slabých signálů, které v některých jádrech i úplně chyběly (obr. č. 9). Ve všech těchto třech případech však byla detekce opakovaná stejným postupem již úspěšná (obr. č. 10) a důvod této chyby se nepodařilo zjistit. Ve větším množství případů pak také byla pozorována absence signálů v části vzorku, v žádném z případů to ale nevedlo k nemožnosti daný vzorek hodnotit (vždy byla přítomna i oblast nádoru s plnohodnotnou detekcí). I přes výše zmíněné však počet opakovaných vyšetření z důvodů preanalytických a zejména pak

analytických chyb výrazně poklesl oproti původnímu postupu až o 10 %, což nejlépe ilustruje tabulka porovnávající počty vyšetření a jejich opakování za rok 2019 (tab. č. 1).

Závěr

Optimalizovaná metoda Dual ISH detekce amplifikace genu *ERBB2* přináší jednoznačně lepší výsledky v porovnání s původním postupem. Cena za test jednoho skla je sice vyšší v porovnání s původním postupem, nicméně pokles počtu opakovaných vyšetření tento fakt plně kompenzuje, neboť nedochází ke zvýšení celkových nákladů na vyšetření. Nová metoda je výrazně robustnější a na základě našich zkušeností můžeme přechod na ni plně doporučit.



MUDr. Tomáš Rozkoš, Ph.D.

Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 12
Kontakt: tomas.rozkos@fnhk.cz

Patolog, pracující v oboru od roku 2009, se specializací na onkologickou pneumopatologii a vyšetřování prediktivních markerů pomocí imunohistochemie a in situ hybridizace.

LITERATURA

1. Grogan, MT, et al.: *Interpretation Guide Ventana INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay.*
2. Grogan, MT, et al.: *VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Interpretation Guide for Breast and Gastric Carcinoma.*