

Biomarkers & QCmarkers of Breast Cancer

Pichet Sampatanukul, MD., MSc
The Queen Sirikit Centre for Breast Cancer,
Thai Red Cross Society,
Bangkok, Thailand

Biomarkers

- Characteristics able objectively measured and evaluated
- Indicators of normal biological processes, pathological processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention

Biomarkers classified by Application

- Diagnostic biomarkers
- Disease prognostic biomarkers
- Biomarkers for predicting the clinical response to an intervention

Breast Cancer Categories for Management

- Early stage of breast cancer
- Locally advanced breast cancer
- Metastatic breast cancer

Management for Early Breast Cancer

Surgery

Radiation Rx

Adjuvant
systemic Rx

*Prognostic
BIOMARKERS*

Chemo +/- Hormonal *vs* Hormonal
Chemo +/- Anti-HER2

Standard Prognostic Characteristics

*Prognostic
BIOMARKERS*

- Age
- Menopausal status
- Tumor size
- Lymph node status
- Histological grade
- ER
- HER2

Management for Early Breast Cancer

Surgery

Radiation Rx

Adjuvant
systemic Rx

*Predictive
BIOMARKERS*

Chemo +/- Hormonal *vs* Hormonal
Chemo +/- Anti-HER2

Breast Cancer Biomarkers

Essential

- IHC - ER/PgR/HER2/Ki67
- ISH – *HER2*

Gene Expression Profile

- Oncotype DXtm
- Prosignatm (PAM 50)

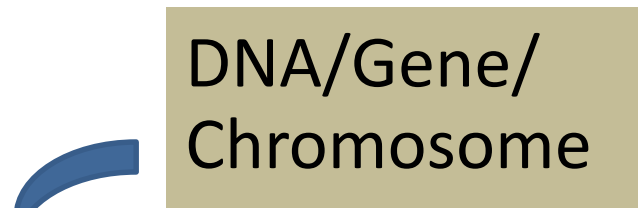
Breast Cancer Biomarkers

Essential

- IHC - ER/PgR/HER2/Ki67
- ISH – *HER2*

Gene Expression Profile

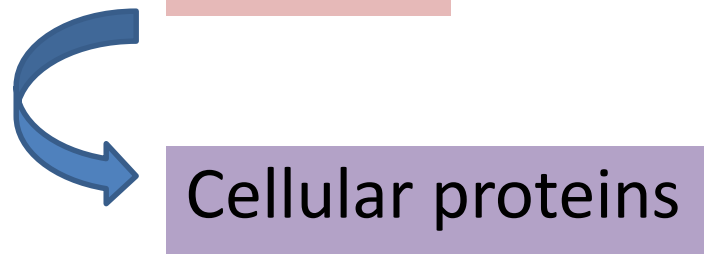
- Oncotype DXtm
- Prosignatm (PAM 50)



DNA analysis



Gene Expression
Profile (GEP) assay



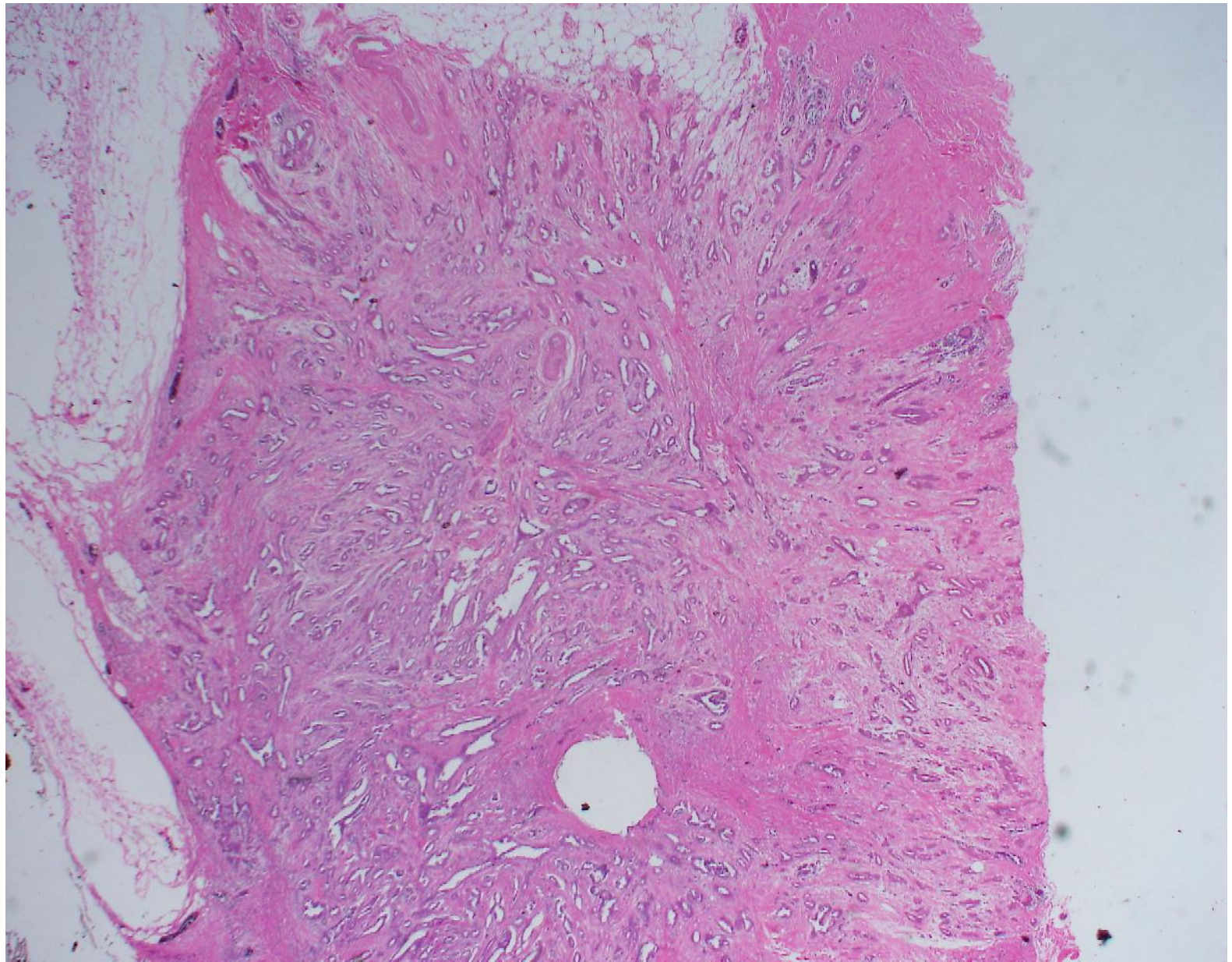
Protein Expression
Profile (PEP) assay

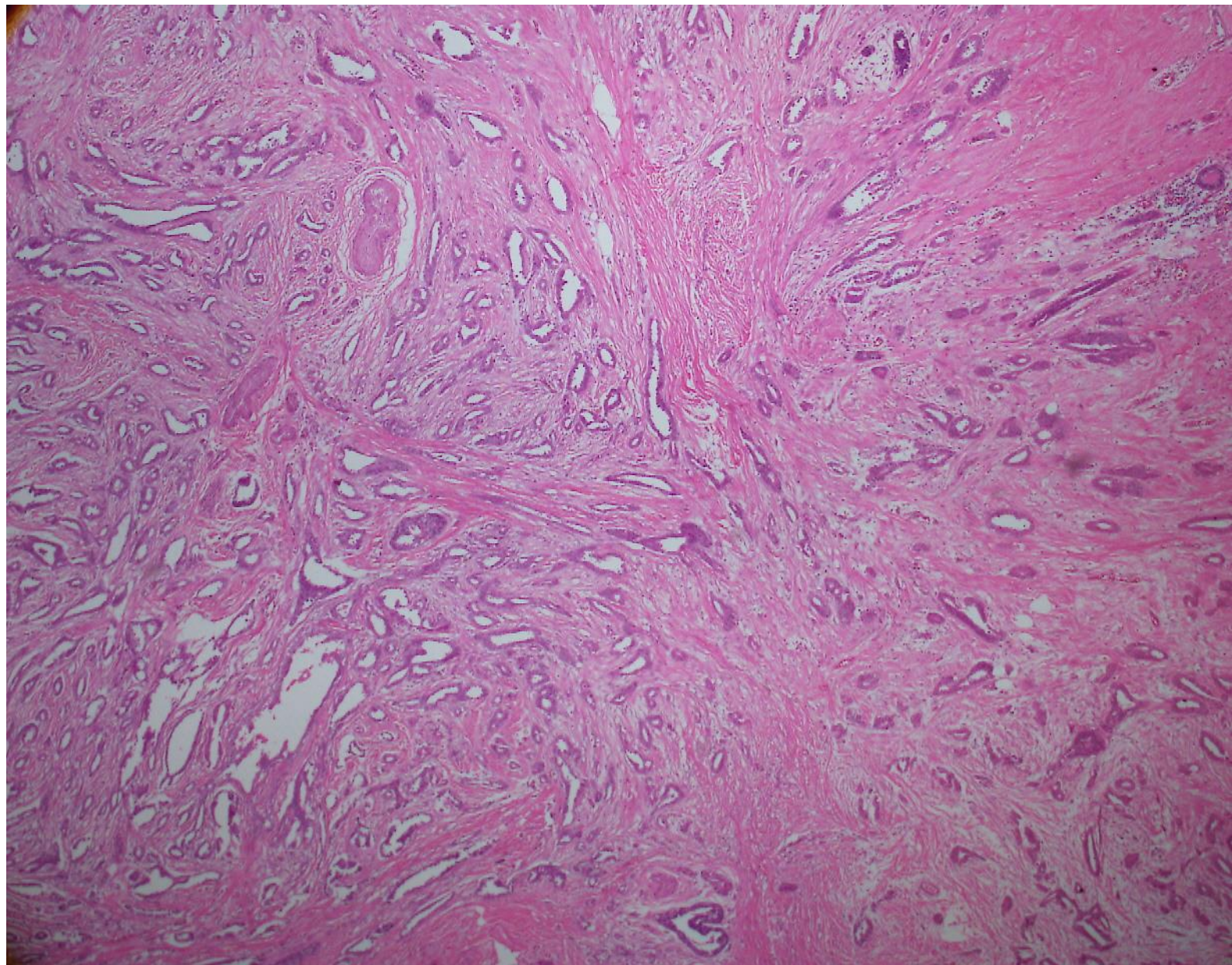
Cellular structure/
morphology

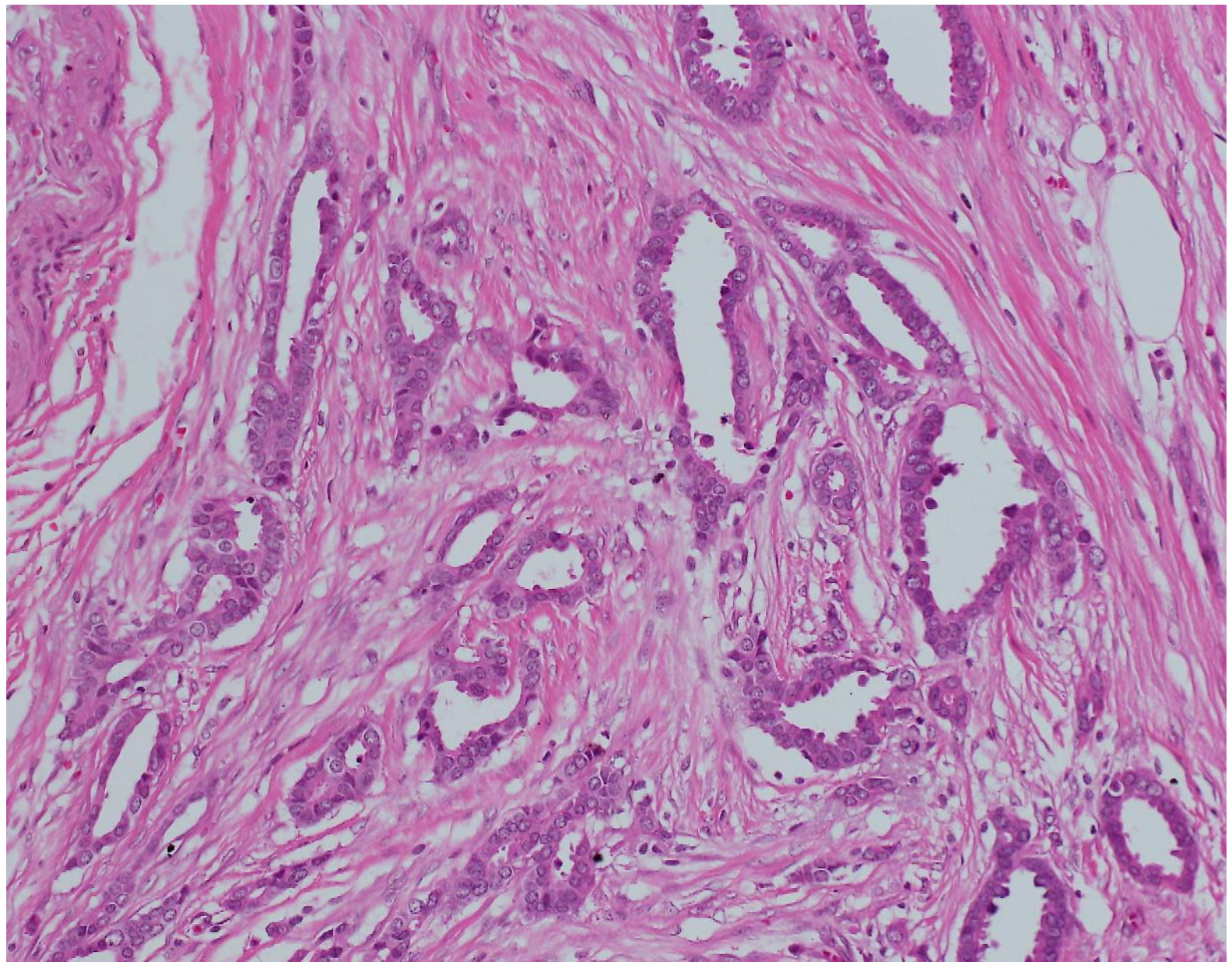
Cellular pattern/
tissue

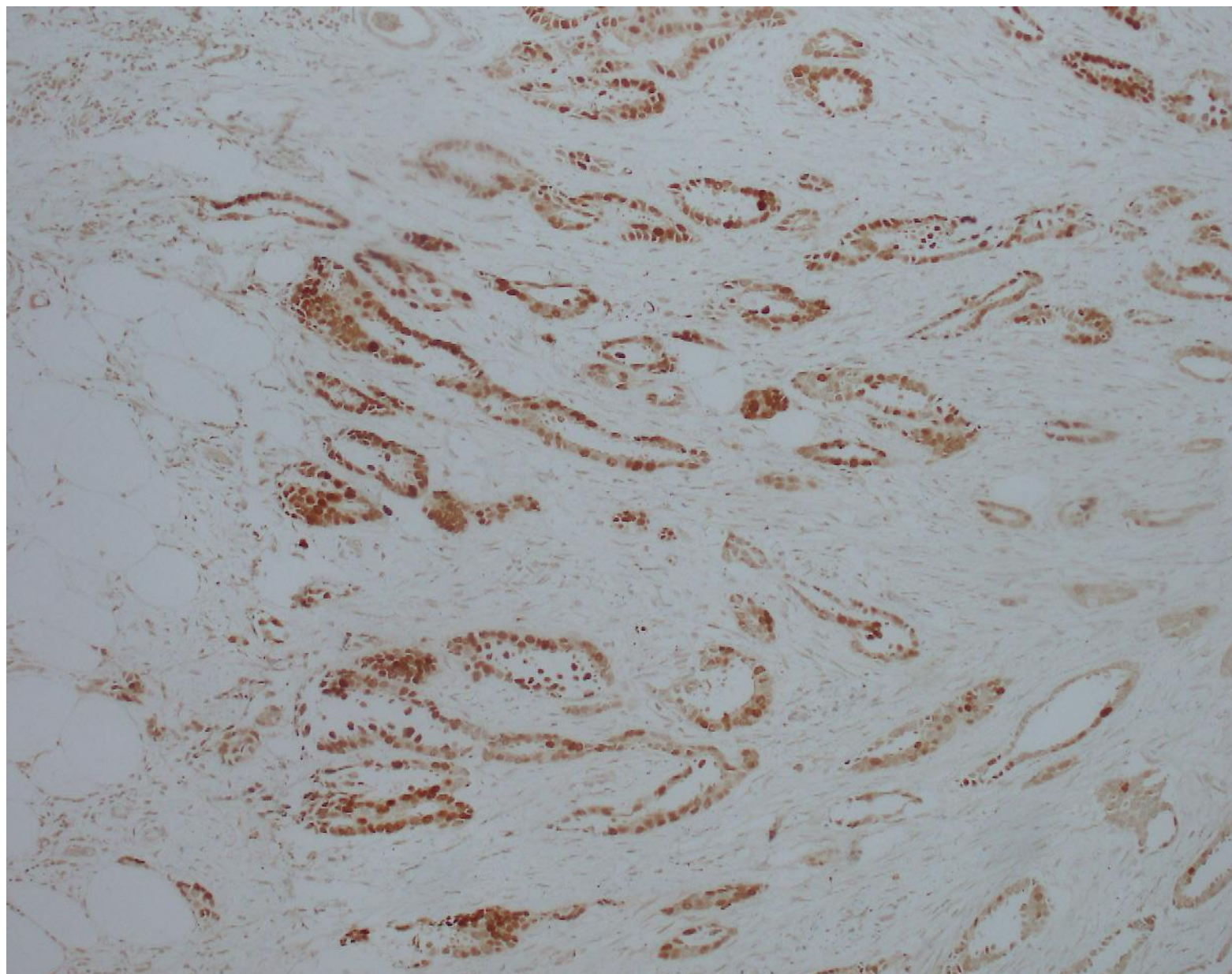
Case 01

- Female 57 years old
- Breast nodule, 1 cm, in left breast
- Wide excision + Sentinel node biopsy
- Tubular carcinoma, pT1N0









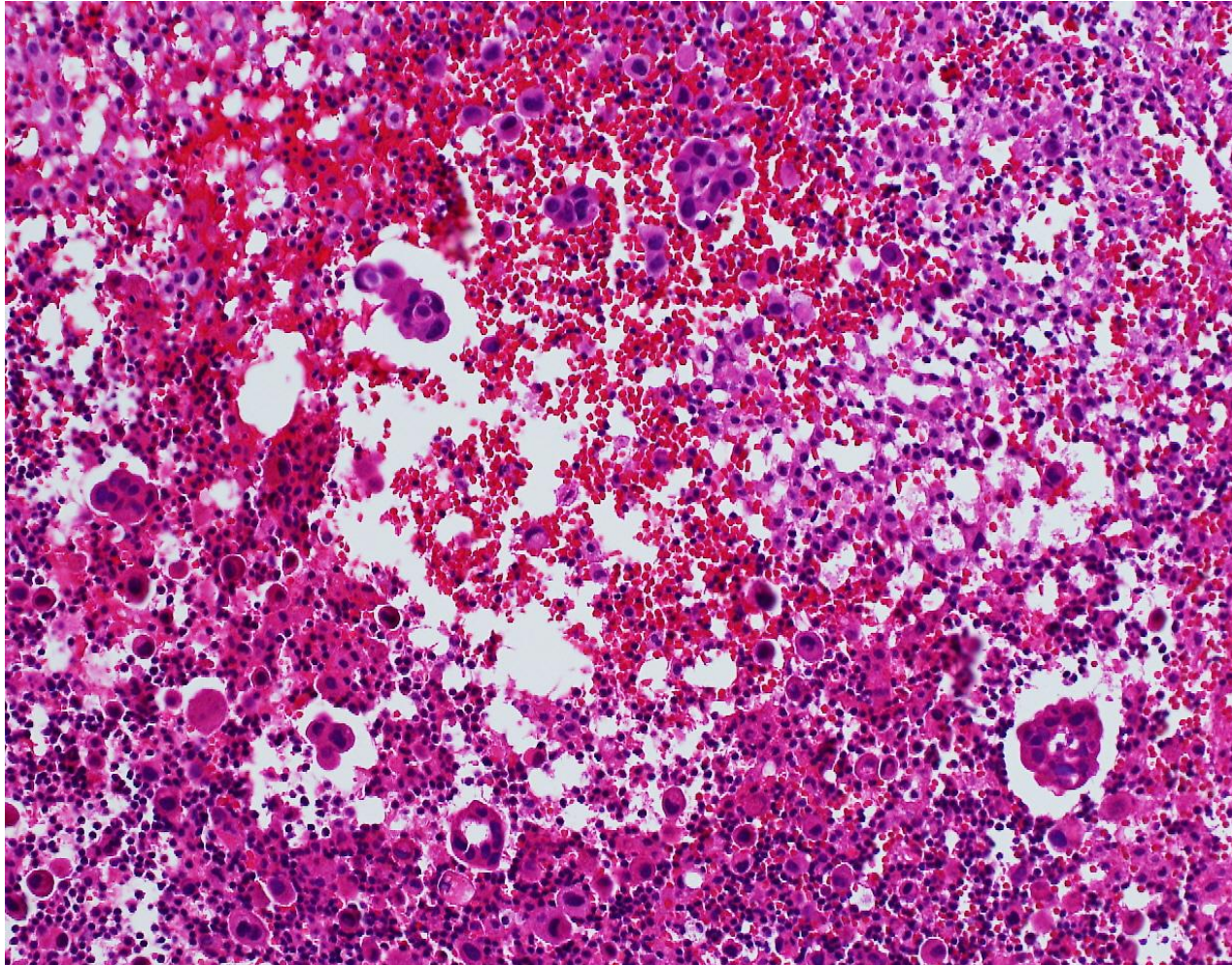
Case 01

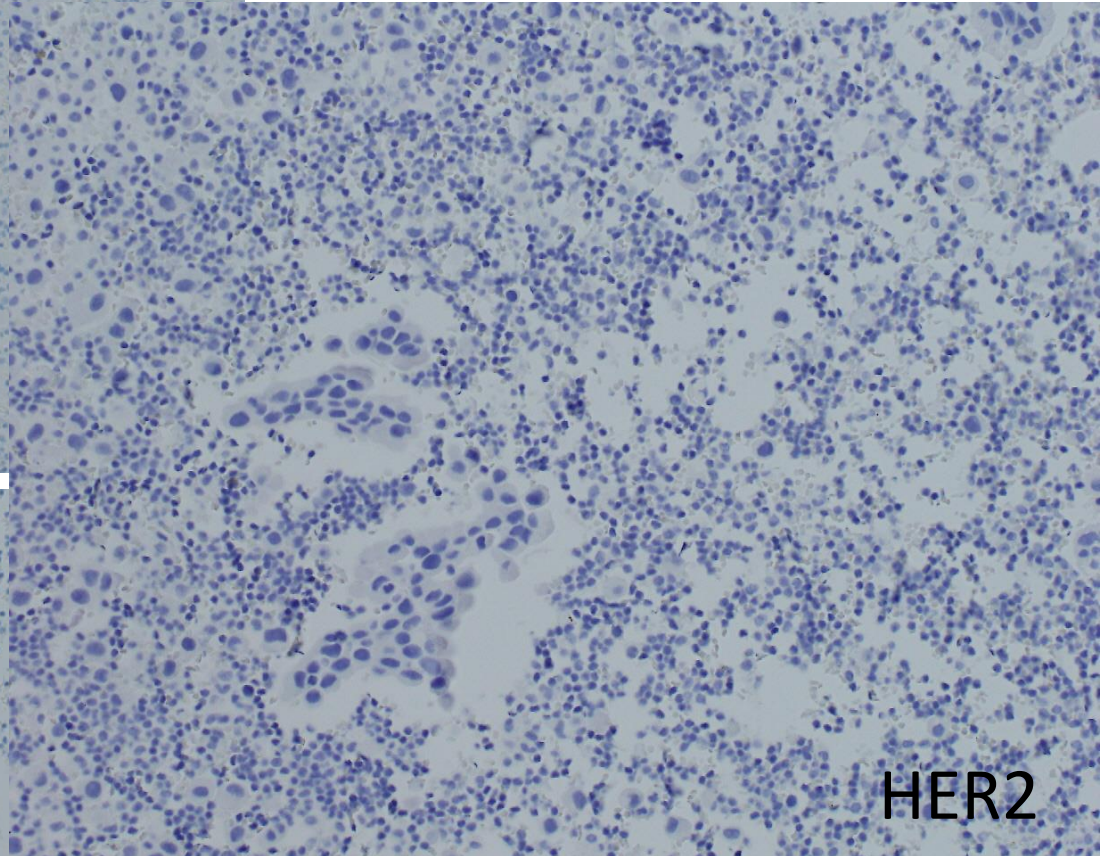
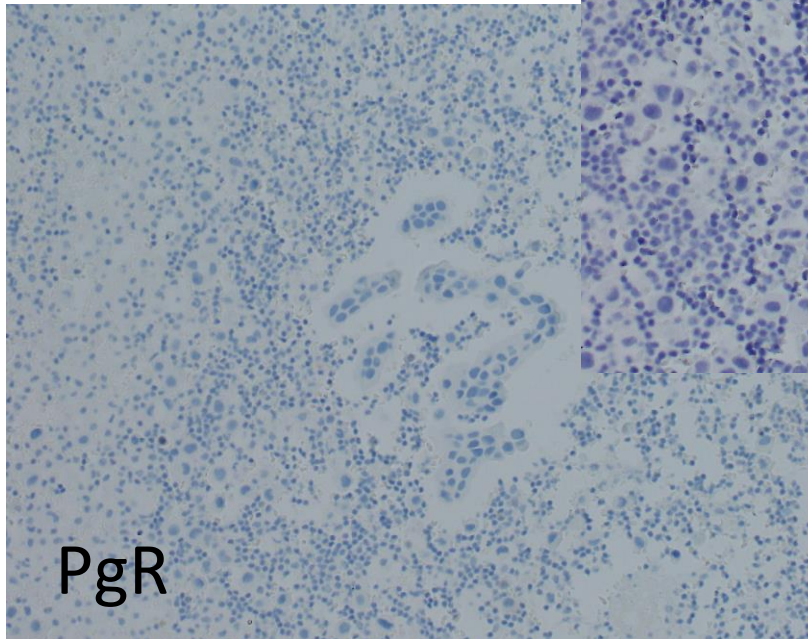
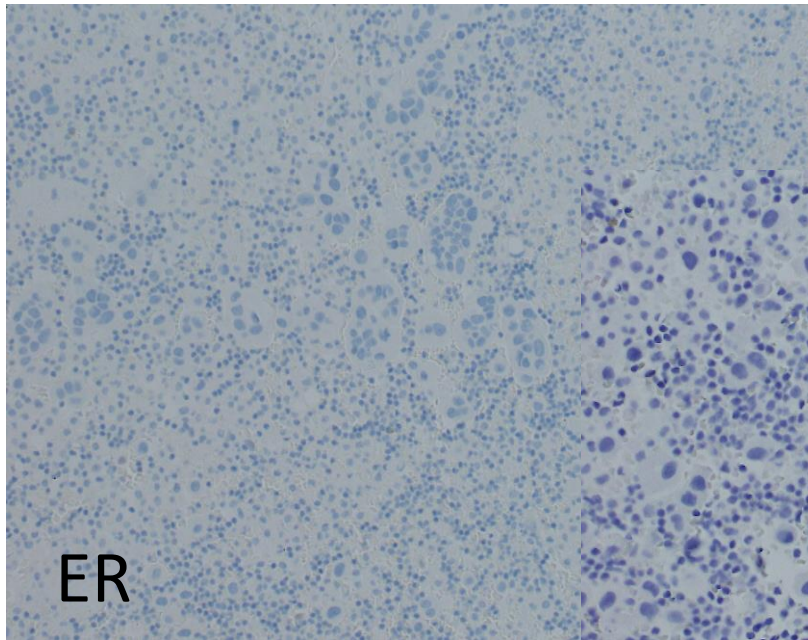
Prognostic BIOMARKERS

- | | |
|----------------------|-----------|
| • Age | favorable |
| • Menopausal status | favorable |
| • Tumor size | favorable |
| • Lymph node status | favorable |
| • Histological grade | favorable |
| • ER | favorable |
| • HER2 | favorable |

No chemotherapy was prescribed.

...5 years later, she presented
with bone metastasis.

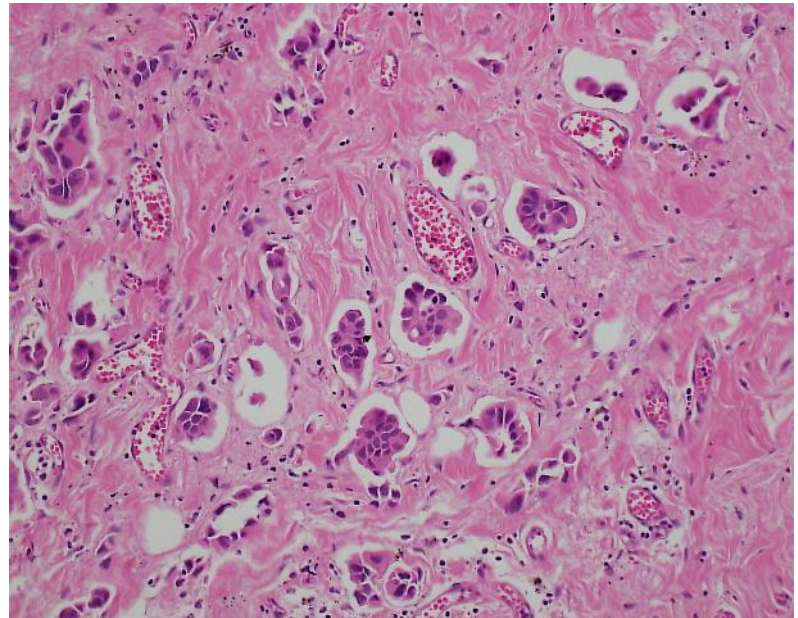
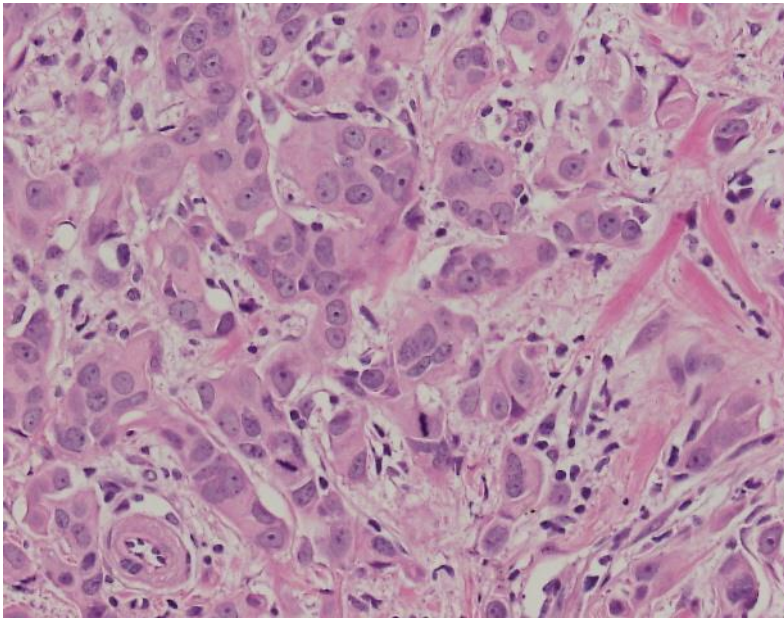
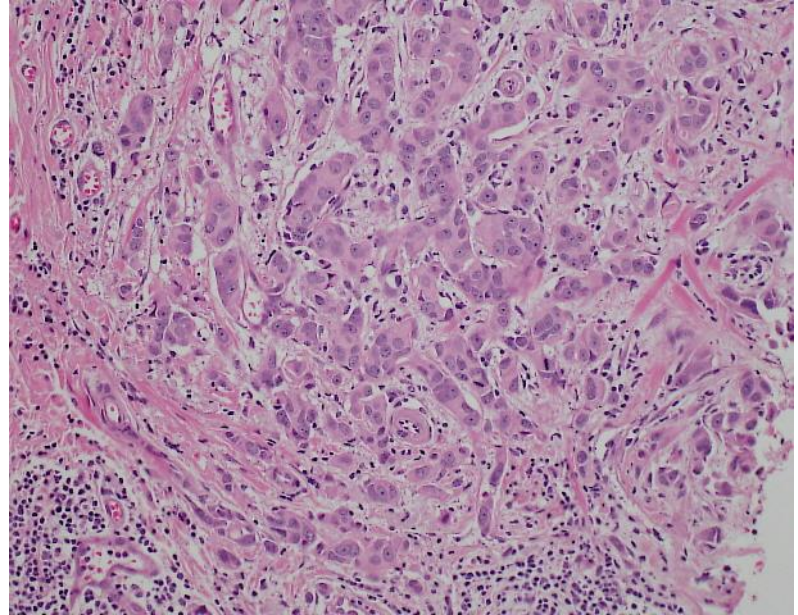
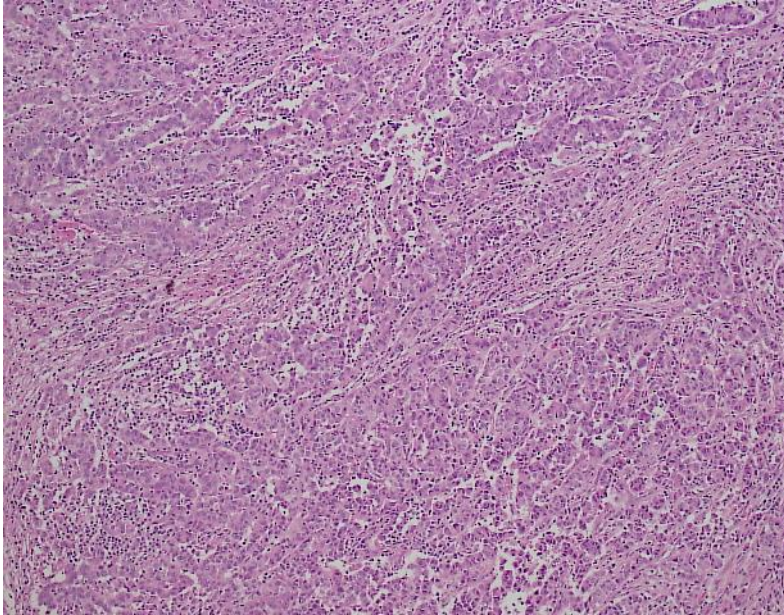


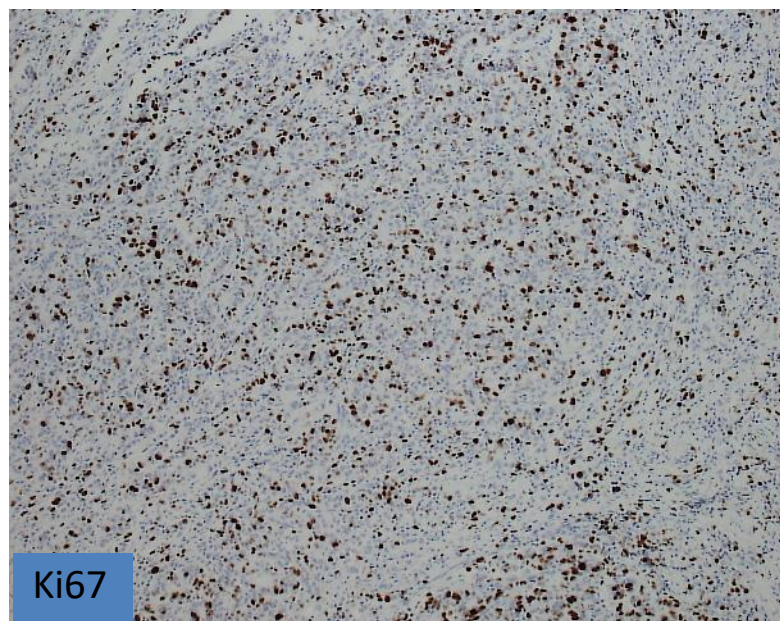
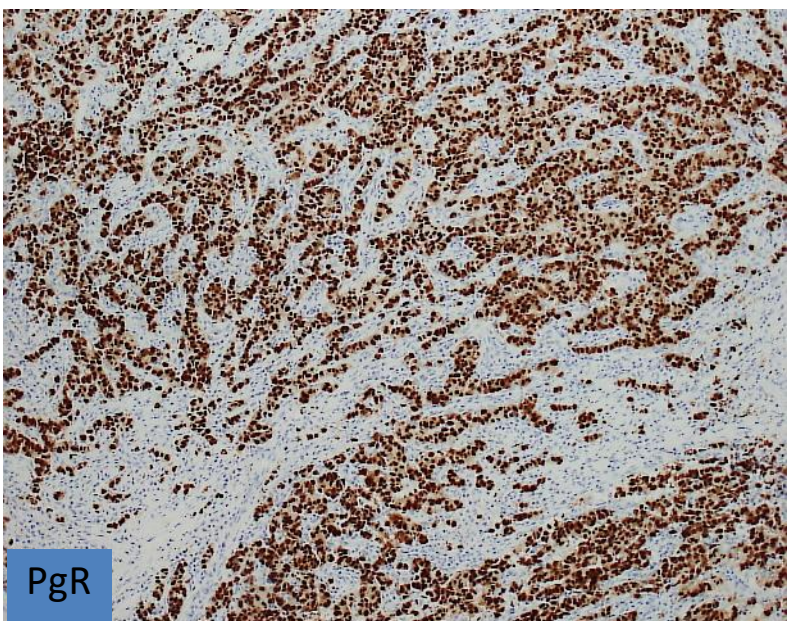
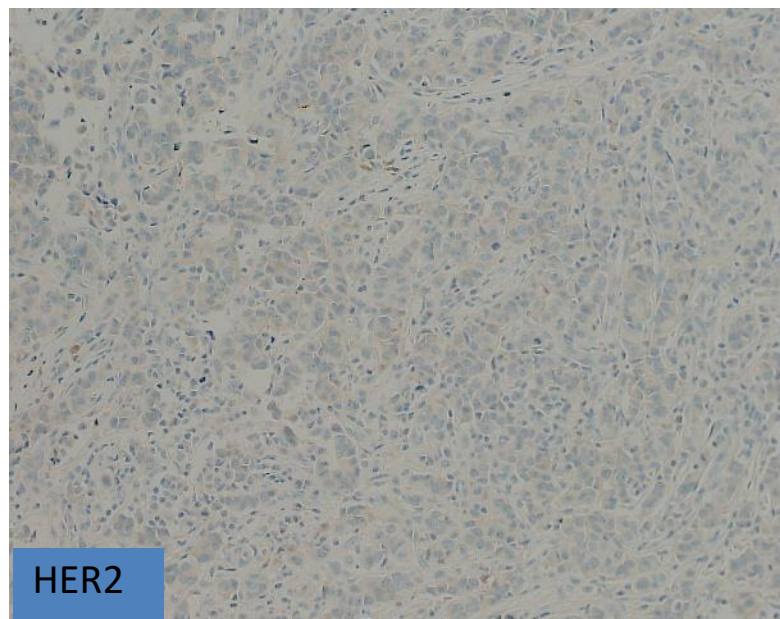
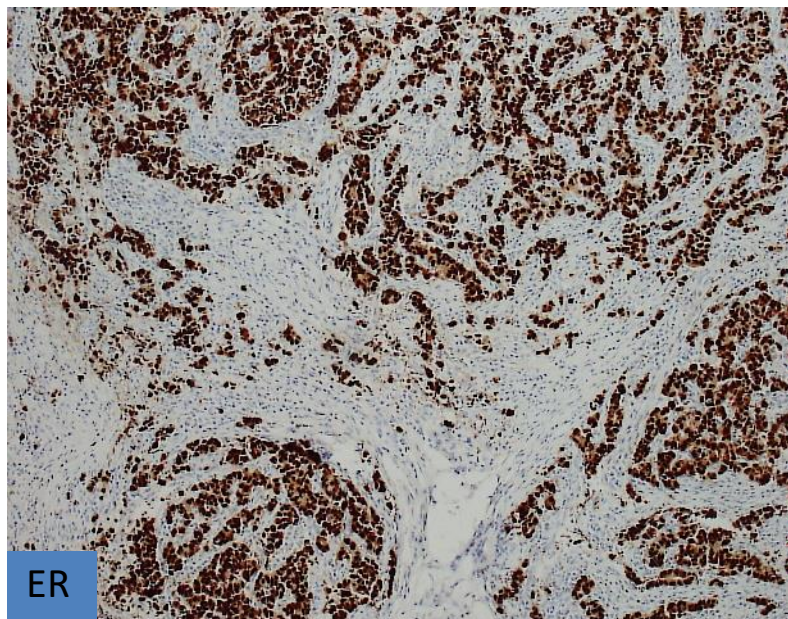


from metastases

Case 02

- Female 58
- Left breast nodule, 1.5 cm
- Wide excision + sentinel node biopsy
- Invasive ductal carcinoma, grade II, pT1N0
- LVI – positive





Case 02

Prognostic BIOMARKERS

- | | |
|----------------------|------------|
| • Age | favorable |
| • Menopausal status | favorable |
| • Tumor size | favorable |
| • Lymph node status | ?favorable |
| • Histological grade | ?favorable |
| • ER | favorable |
| • HER2 | favorable |

Oncotype DX assay was done.

Breast Cancer Report - Node Negative Prognosis

Genomic Health, Inc.
301 Penobscot Drive, Redwood City, CA 94063 USA
USA/Canada: +1.866.ONCOTYPE
International: www.oncotypedx.com/contact
www.oncotypedx.com
CLIA Number 05D1018272

Patient/ID:
Sex:
Date of Birth:
Medical Record/Patient #:
Date of Surgery:
Specimen Type/ID:

Requisition:
Specimen Received:
Date Reported:
Client:
Ordering Physician:
Submitting Pathologist:
Additional Recipient:

Recurrence Score® Result

21

Oncotype DX® Breast Cancer Assay uses RT-PCR to determine the expression of a panel of 21 genes in tumor tissue. The Recurrence Score result is calculated from the gene expression results and ranges from 0-100.

The findings are applicable to women who have stage I or II node negative (N-), estrogen receptor positive (ER+) breast cancer, and will be treated with 5 years of tamoxifen (tam). It is unknown whether the findings apply to other patients outside these criteria.

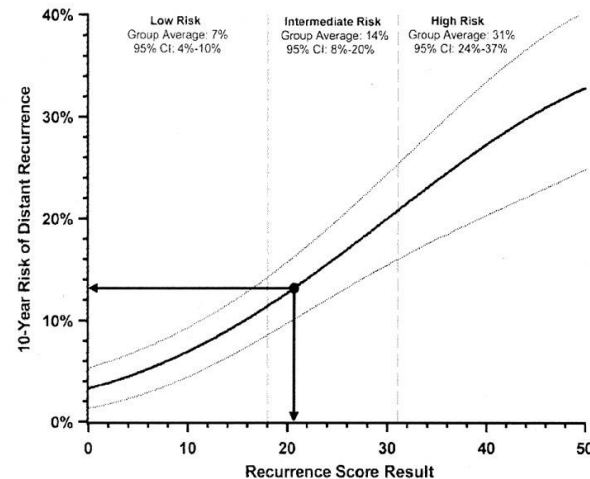
Clinical Experience: The following results are from a clinical validation study that included 668 patients from the NSABP B-14 study. The study included female patients with stage I or II, N-, ER+ breast cancer treated with 5 years of tam.¹

Prognosis: 10-Year Risk of Distant Recurrence after 5 Years of Tam, Based on the Recurrence Score Result (from NSABP B-14)

10-Year Risk of Distant Recurrence

Tam Alone

13% —
(95% CI: 10%-16%)



¹ Paik et al. N Engl J Med. 2004.

Laboratory Director: Patrick Joseph, MD

This test was developed and its performance characteristics determined by Genomic Health, Inc. The laboratory is regulated under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) as qualified to perform high-complexity clinical testing. This test is used for clinical purposes. It should not be regarded as investigational or for research. These results are adjunctive to the ordering physician's workup.

© 2004-2014 Genomic Health, Inc. All rights reserved. Genomic Health, Oncotype DX, and Recurrence Score are trademarks of Genomic Health, Inc.

GH0004 Rev026

Breast Cancer Report - Node Negative
Prediction of Chemotherapy Benefit

Genomic Health, Inc.
301 Penobscot Drive, Redwood City, CA 94063 USA
USA/Canada: +1.866.ONCOTYPE
International: www.oncotypedx.com/contact
www.oncotypedx.com
CLIA Number 05D1018272

Patient/ID:
Sex:
Date of Birth:

Requisition:
Specimen Received:
Date Reported:

**Recurrence
Score®
Result**

21

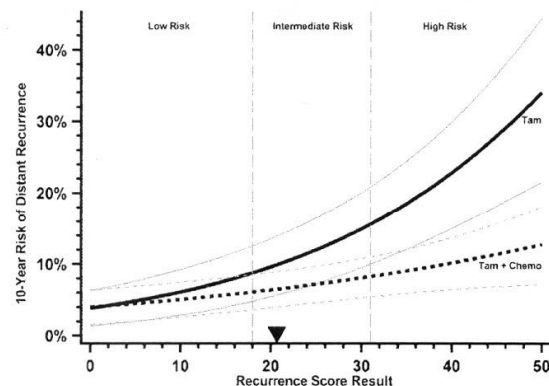
The findings are applicable to women who have stage I or II node negative (N-), estrogen receptor positive (ER+) breast cancer and will be treated with 5 years of tamoxifen (tam). It is unknown whether the findings apply to other patients outside these criteria.

Clinical Experience: The following results are from a clinical validation study that included 651 patients from the NSABP B-20 study. The study included female patients with stage I or II, N-, ER+ breast cancer. Patients were randomized to either tam alone or tam plus CMF or MF chemotherapy. For patients in the pre-specified group with Recurrence Score results ≥ 31 , the group average 10-year risks (95% CI) of distant recurrence were 40% (25%, 54%) for tam alone and 12% (6%, 18%) for tam + CMF/MF.¹

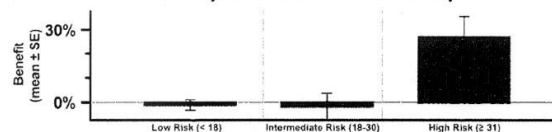
**Prediction of Chemotherapy Benefit after 5 Years of Tam,
Based on the Recurrence Score Result (from NSABP B-20)**

Tam Alone ———

Tam + Chemo - - - - -



**Absolute Benefit of Chemotherapy at 10 Years
by Recurrence Score Risk Group**



¹ Paik et al. J Clin Oncol. 2006.

Laboratory Director: Patrick Joseph, MD

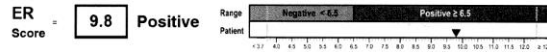
This test was developed and its performance characteristics determined by Genomic Health, Inc. The laboratory is regulated under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) as qualified to perform high-complexity clinical testing. This test is used for clinical purposes. It should not be regarded as investigational or for research. These results are adjunctive to the ordering physician's workup.

© 2004-2014 Genomic Health, Inc. All rights reserved. Genomic Health, Oncotype DX, and Recurrence Score are trademarks of Genomic Health, Inc.

GH004 Rev020

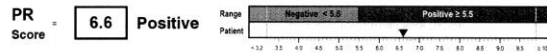
PatientID: _____
 Sex: _____
 Date of Birth: _____
 Regulation: _____
 Specimen Received: _____
 Date Reported: _____

The OncoTYPE DX[®] assay uses RT-PCR to determine the RNA expression of the genes below. These results may differ from estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), or human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) results reported using other methods or reported by other laboratories. The ER, PR, and HER2 Scores are also included in the calculation of the Recurrence Score result.

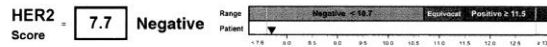


The ER Score positive/negative cut-off of 6.5 units was validated from a study of 761 samples using the 1D5 antibody (immunohistochemistry) and 607 samples using the SP1 antibody (immunohistochemistry). The standard deviation for the ER Score is less than 0.5 units.¹

Clinical Experience:
 For ER+ breast cancer, the magnitude of tamoxifen benefit increases as the ER Score increases from 6.5 to ≥12.5.¹
 Please note: The Average Risk of Distant Recurrence reported on Page 1 based on the Recurrence Score result was determined in patients who received 5 years of tamoxifen treatment and takes into account the magnitude of tamoxifen benefit indicated by the ER Score.



The PR Score positive/negative cut-off of 5.5 units was validated from a study of 761 samples using the PR636 antibody (immunohistochemistry) and another study of 607 samples using the PR636 antibody (immunohistochemistry). The standard deviation for the PR Score is less than 0.5 units.¹



The HER2 positive cut-off of ≥ 11.5 units, equivocal range from 10.7 to 11.4 units, and negative cut-off of < 10.7 units were validated from concordance studies of 755 samples using the HerceptTest[™] assay (immunohistochemistry) and another study of 568 samples using the PathVision[™] assay (FISH). The standard deviation for the HER2 score is less than 0.5 units.²

References:
 1. ER Score based on quantitative (ESR) expression (estrogen receptor), PR Score based on quantitative (PR636) expression (progesterone receptor), HER2 Score based on quantitative (ER62) expression.
 2. Baer et al. J Clin Oncol 2008; and Baehner et al. ASCO Breast 2007. Abstract 86.
 3. Baer et al. J Clin Oncol 2011.
 4. Baehner et al. J Clin Oncol 2010; and Baehner et al. ASCO Breast 2007. Abstract 41.

Laboratory Director: Patrick Joseph, MD

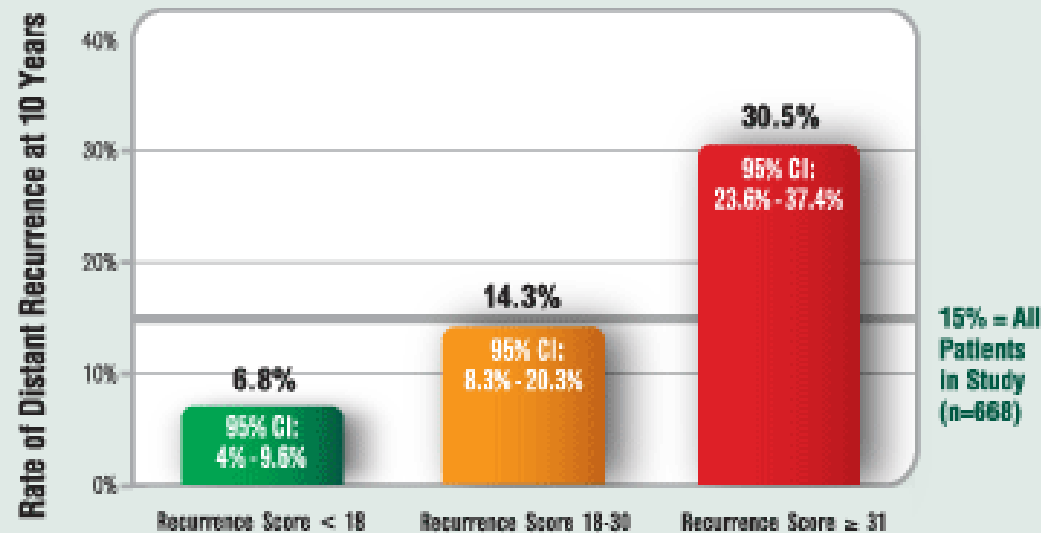
This test was developed and its performance characteristics determined by Genomic Health, Inc. The laboratory is regulated under the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) as qualified to perform high-complexity clinical testing. This test is used for clinical purposes. It should not be regarded as investigational or for research. These results are additive to the treating physician's workup.

© 2004-2014 Genomic Health, Inc. All rights reserved. Genomic Health, OncoTYPE DX, and Recurrence Score are trademarks of Genomic Health, Inc.

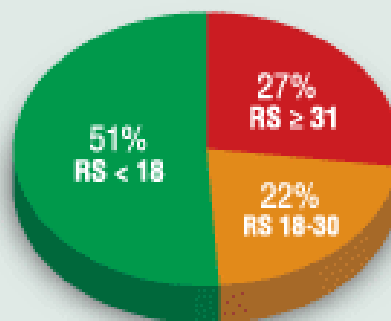
12/08/14 REVISED

She did not receive chemo Rx, to date
 (5 years later), she is well.

Rate of Distant Recurrence at 10 Years by Oncotype DX Risk Group in the Clinical Validation Study



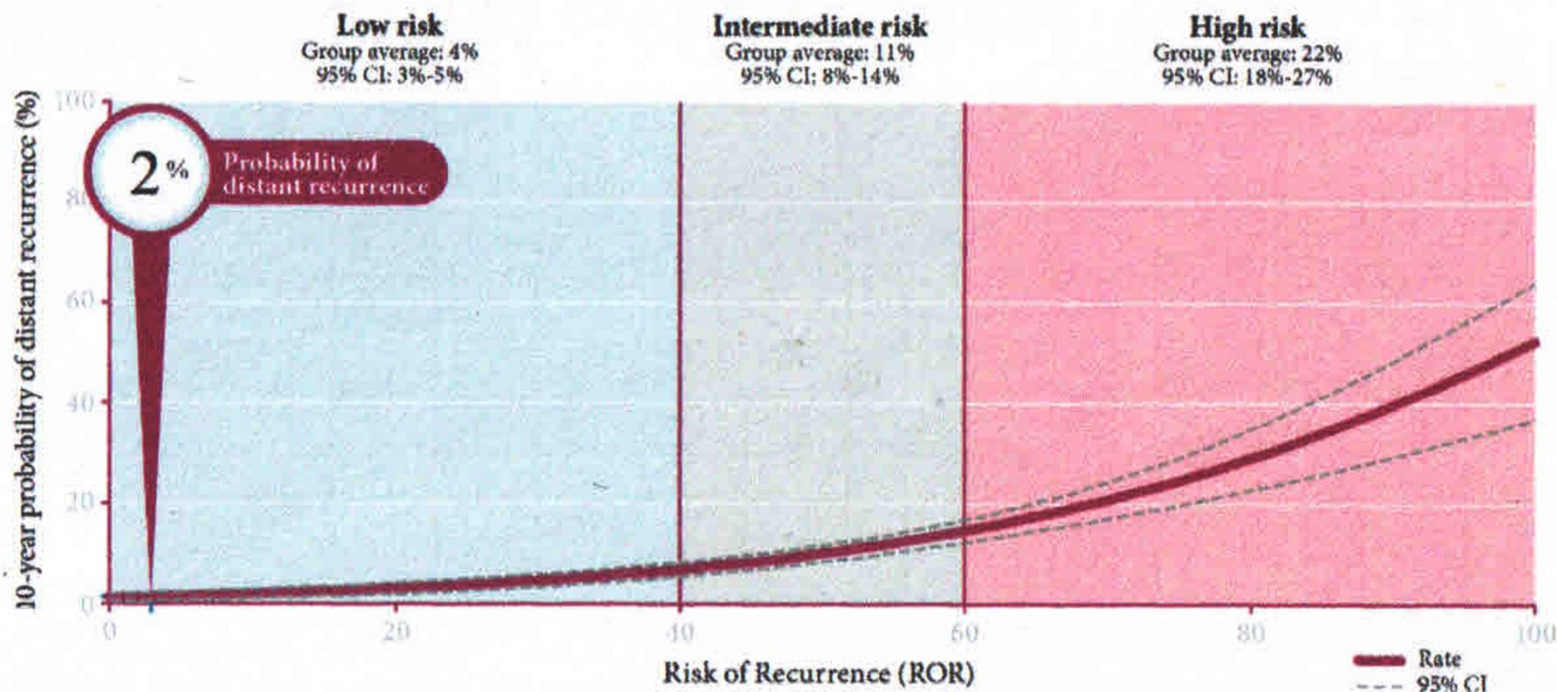
Population Distribution by Oncotype DX Risk Group in the Clinical Validation Study



Probability of Distant Recurrence:

In the clinical validation studies, patients who were node-negative, luminal A subtype, with an ROR score of 3 were in the low-risk group. This group averaged a 4% probability of distant recurrence at 10 years.

The Prosigna® algorithm has been validated by 2 randomized clinical trials including more than 2400 patients with varying rates of distant recurrence. An analysis of these 2 clinical validation studies shows that the probability of distant recurrence for the low-risk population is 4%, while the high-risk population has a significantly greater probability of distant recurrence.†



For more information, visit PROSIGNA.com or e-mail info@prosigna.com

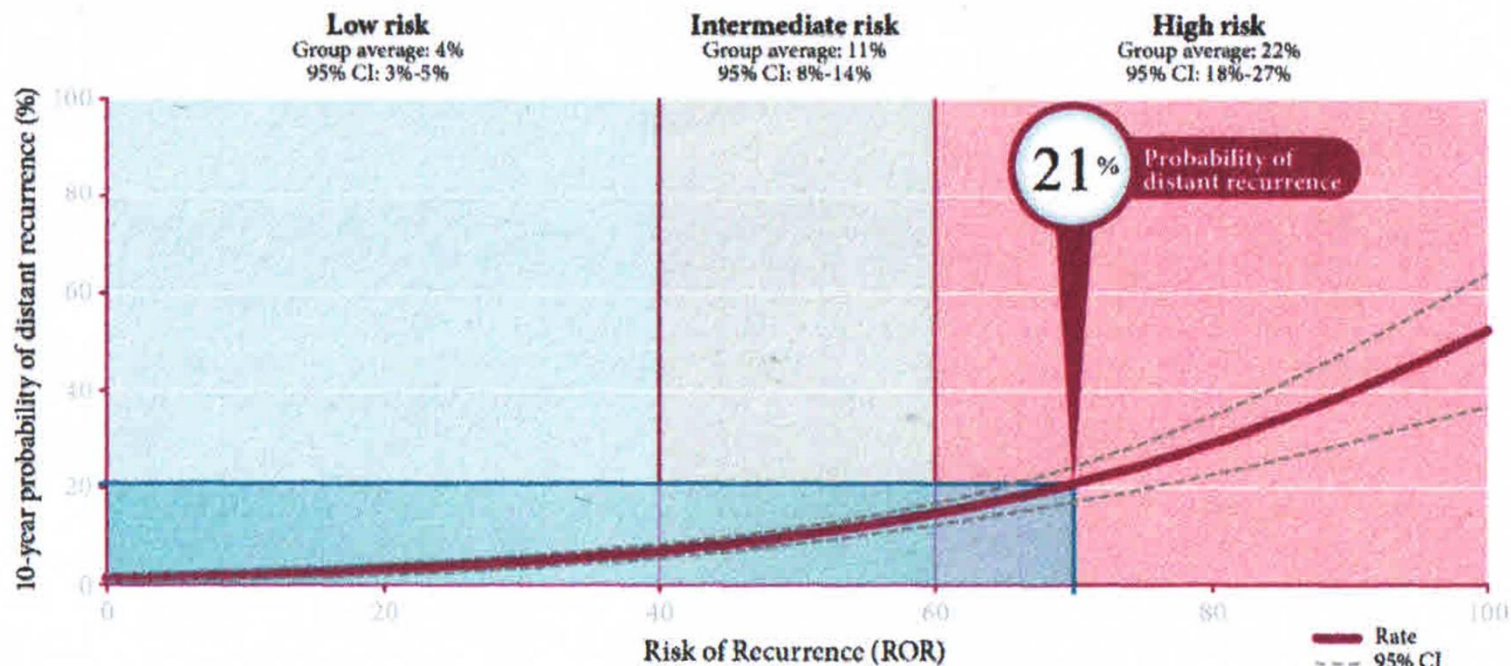
†Data apply to patients being treated with hormone therapy for 5 years as in the tested patient population. See Package Insert for further information on therapy regimens and tested patient population. It is unknown whether these findings can be extended to other patient populations or treatment schedules.

©2014-2017 NanoString Technologies, Inc.

Probability of Distant Recurrence:

In the clinical validation studies, patients who were node-negative, luminal B subtype, with an ROR score of **70** were in the high-risk group. This group averaged a **22%** probability of distant recurrence at 10 years.

The Prosigna® algorithm has been validated by 2 randomized clinical trials including more than 2400 patients with varying rates of distant recurrence. An analysis of these 2 clinical validation studies shows that the probability of distant recurrence for the high-risk population is 22%.†



For more information, visit PROSIGNA.com or e-mail info@prosigna.com

†Data apply to patients being treated with hormone therapy for 5 years as in the tested patient population. See Package Insert for further information on therapy regimens and tested patient population. It is unknown whether these findings can be extended to other patient populations or treatment schedules.

© 2014-2017 Novartis Pharmaceuticals Corporation

Breast Cancer Biomarkers

Essential

- IHC - ER/PgR/HER2/Ki67
- ISH – *HER2*

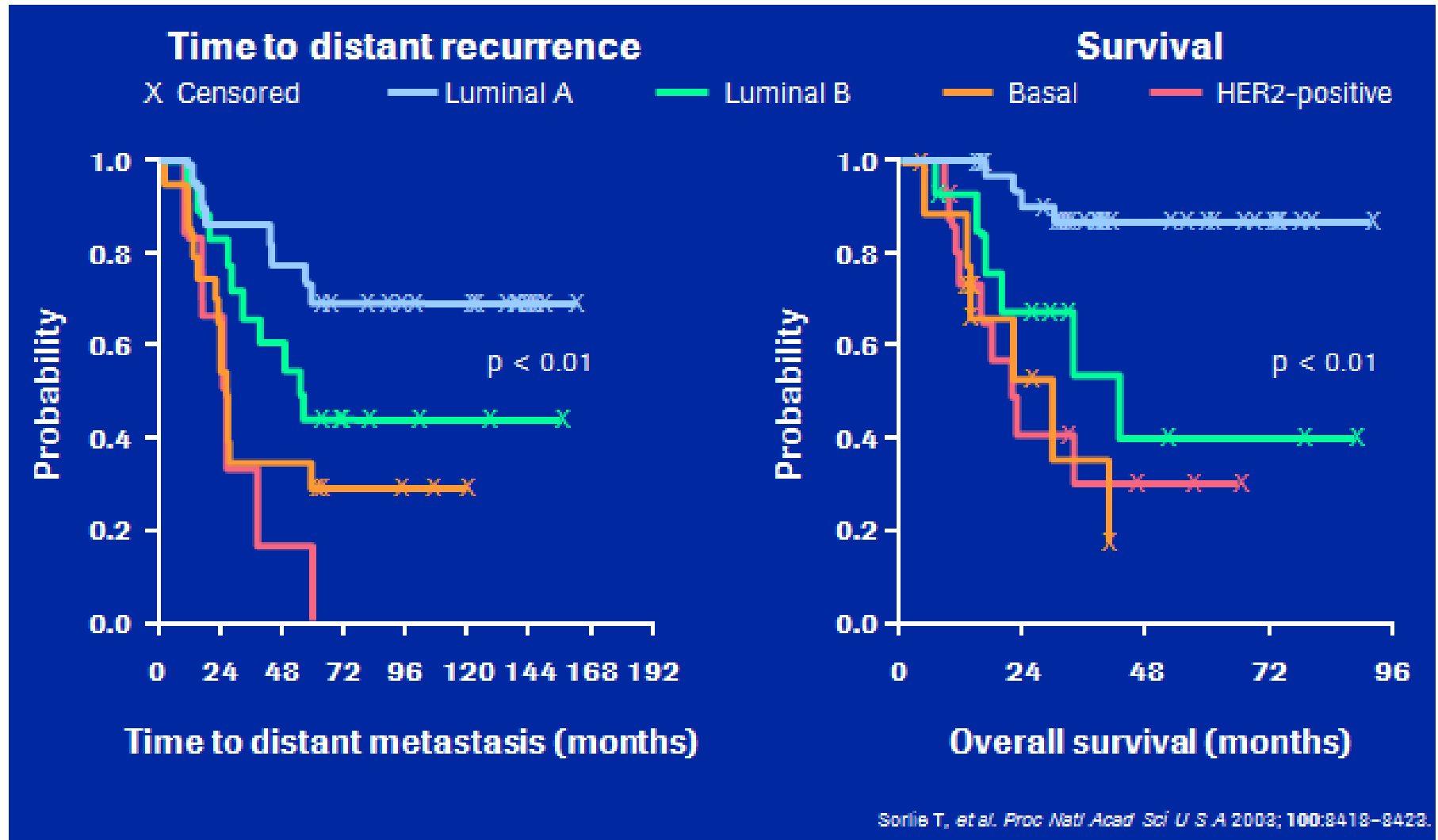
Gene Expression Profile

- Oncotype DXtm
- Prosignatm (PAM 50)

Breast Cancer Biomarkers

- *“One important aspect of the role of Pathology in the evaluation of breast cancer is biomarker testing, specifically the accurate assessment of the ER, PgR, HER2 status of a patient’ breast cancer”*

Time to recurrence and survival by tumor type



Breast cancer molecular subtypes

Intrinsic subtype	Clinico-pathologic surrogate definition
Luminal A	'Luminal A-Like' ER + and PgR + HER2 – Ki-67 'low' (<20%)
Luminal B	'Luminal B-like (HER2-)' ER+ HER2- And at least one of: Ki-67 'high' PgR 'negative or low'
	'Luminal B-like (HER2+)' ER+ HER2+ or amplified Any Ki-67 Any PgR
HER2 overexpression	'HER2+ (non-luminal)' HER2+ or amplified ER and PgR –
Basal-like	'Triple negative (ductal)' ER and PgR – HER2 –

- have the best prognosis, with fairly high survival rates and fairly low recurrence rates
- Luminal treatment for these tumors often includes hormone therapy

often diagnosed at a younger age than those with luminal A tumors
compared to luminal A tumors, they tend to have factors that lead to a poorer prognosis including

fairly poor prognosis and are prone to early and frequent recurrence and metastases

often aggressive and have a poorer prognosis compared to the estrogen receptor-positive subtypes (luminal A and luminal B tumors)

Critical values

Intrinsic subtype	Clinico-pathologic surrogate definition
Luminal A	'Luminal A-Like' ER + and PgR + HER2 – Ki-67 'low' (<20%)
Luminal B	'Luminal B-like (HER2-)' ER+ HER2- And at least one of: Ki-67 'high' PgR 'negative or low'
	'Luminal B-like (HER2+)' ER+ HER2+ or amplified Any Ki-67 Any PgR
HER2 overexpression	'HER2+ (non-luminal)' HER2+ or amplified ER and PgR –
Basal-like	'Triple negative (ductal)' ER and PgR – HER2 –

• ER negative, positive

1-9%

PgR 0-20%, 51-100%

21-50%

HER2 negative, positive (score 3+)

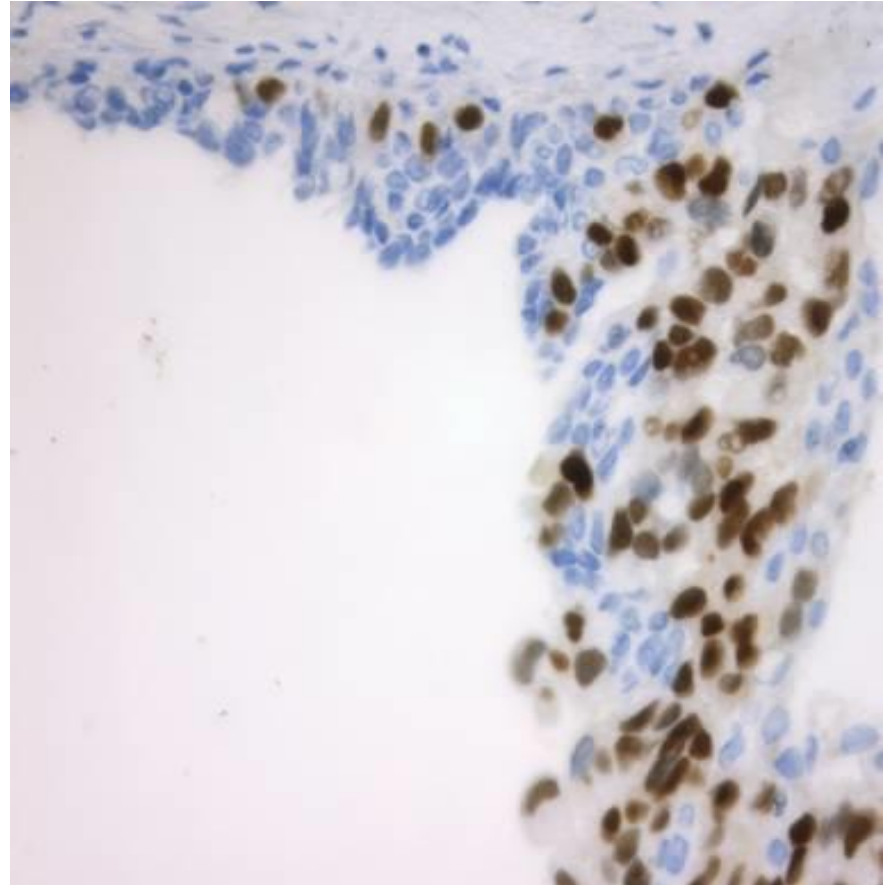
score 2+

Ki67 index <20% 31%-100%

20-30%

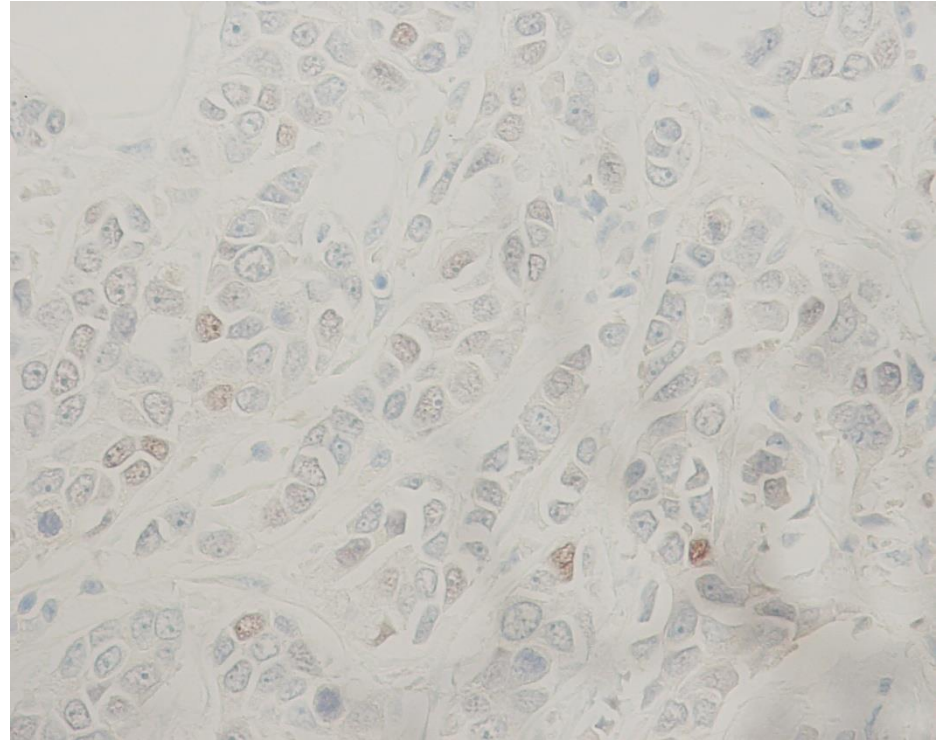
Estrogen Receptor (ER)

- What is Estrogen Receptor?
 - Estrogen is a normal steroid hormone that stimulates breast epithelial growth.
 - The receptor binds the hormone in the nucleus
- What does it stain?
 - ER is directed against ER protein located in the nucleus of both normal and neoplastic (tumor) cells
- Why is it important?
 - Receptor-negative tumors tend to have higher rates of recurrence
 - Receptor-positive tumors can be treated with hormonal therapies, like Tamoxifen and Aromatase inhibitors



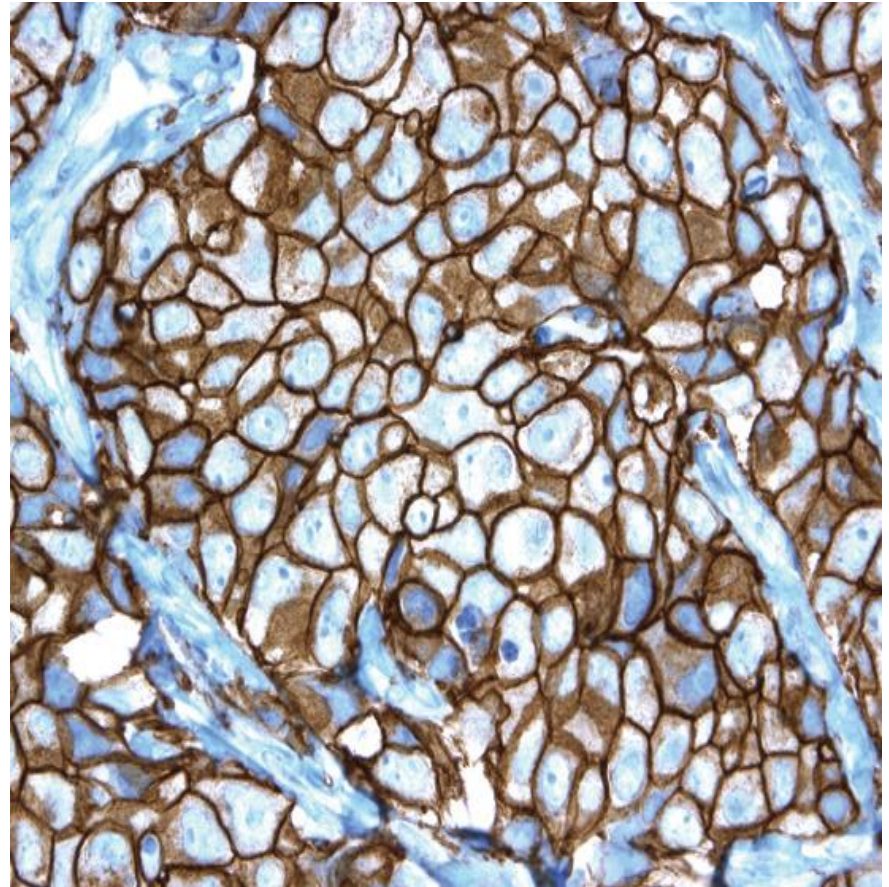
Progesterone Receptor (PgR)

- What is Progesterone Receptor?
 - Progesterone is a normal steroid hormone that promotes ductal maturation and its receptor is induced by estrogen (if you don't have ER you won't have PgR).
- What does it stain?
 - PgR is directed against PgR protein located in the nucleus of both normal and neoplastic (tumor) cells
- Why is it important?
 - Receptor-negative tumors tend to have higher rates of recurrence
 - Receptor-positive tumors can be treated with hormonal therapies, like Tamoxifen and Aromatase Inhibitors



HER-2/*neu*

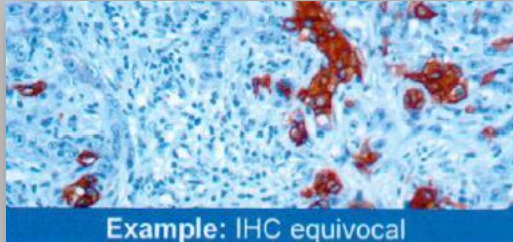
- What is HER-2/*neu*?
 - Also called ErbB2 or *c-erbB-2*
 - Belongs to the EGFR family
 - Protein that promotes cell cancer growth
- What does it stain?
 - Increased amount of HER-2/*neu* protein product on cancer cell surface
- Why is it important?
 - High levels of HER-2/*neu* are related to poorer survival
 - HER-2/*neu* positivity indicates that a patient is more likely to respond to Herceptin™ therapy.



Initial
HER2 test result:
EQUIVOCAL*

Important question to consider:
Is HER2 test result adequate?

Initial
HER2 test result:
INDETERMINATE*



Example: IHC equivocal

- **IHC 2+:** based on circumferential membrane staining that is incomplete and /or weak/moderate and >10% of the invasive tumor cells, or complete and circumferential membrane staining that is intense and ≤10% of the invasive tumor cells
- **ISH:** HER2/CEP17 ratio <2.0, average HER2 copy number ≥4.0 and <6.0 signals per cell

**Order reflex test
(same specimen, alternative test)
OR**

**Order new test (new specimen if available,
same or alternative test) if concerns
exist about specimen**



Example: crush artifact

Technical conditions may include:

- Inadequate specimen handling
- Artifacts (crush or edge artifacts) that make interpretation difficult
- Analytic testing failure

**Request another specimen for HER2
testing**

**Note reason for indeterminate test
result on report**

Adoption of the 2013 ASCO/CAP guideline updates may help personalize patient care.

Equivocal IHC:

- Order reflex test on same
- Specimen (ISH) or new
- Specimen (IHC or ISH)

Equivocal ISH:

- Order reflex test on same
- Specimen (IHC) or new
- Specimen (IHC or ISH)

Indeterminate:

- Retest new specimen if quality concerns exist

Ki-67

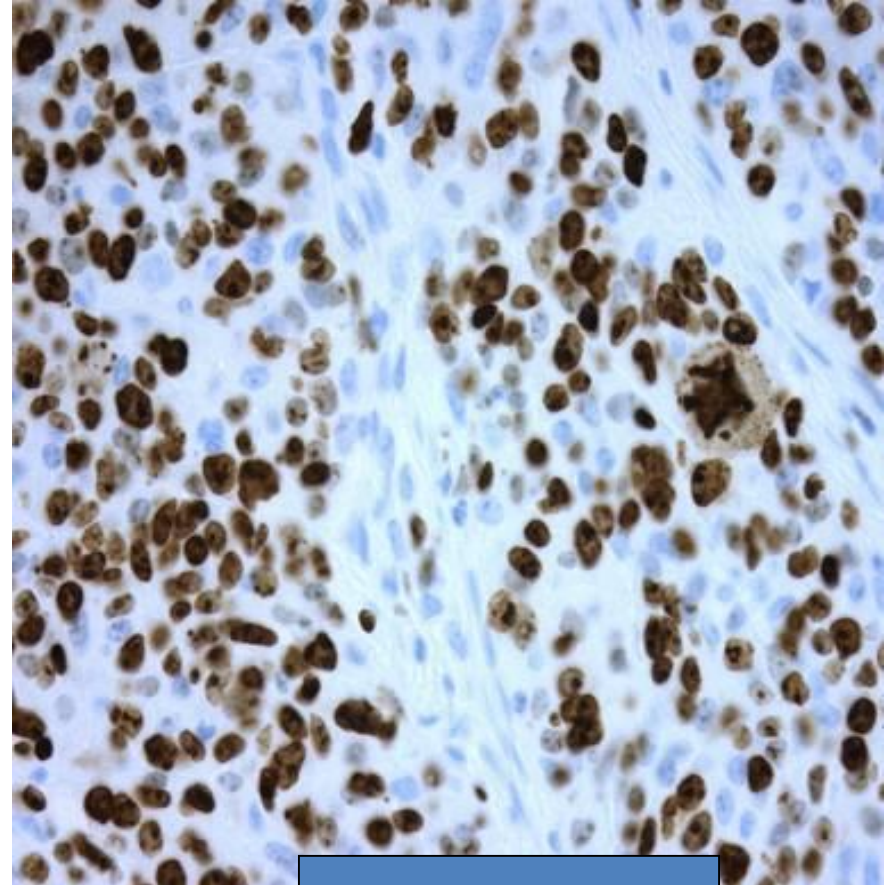
What does it stain?

Proliferating Cells: cells that are growing or multiplying by rapidly producing new cells

Why is it important?

Cells with high levels of proliferative antigen are likely growing and dividing rapidly, which **means that this is a more aggressive tumor.**

A good Ki-67 clone will stain nucleoli



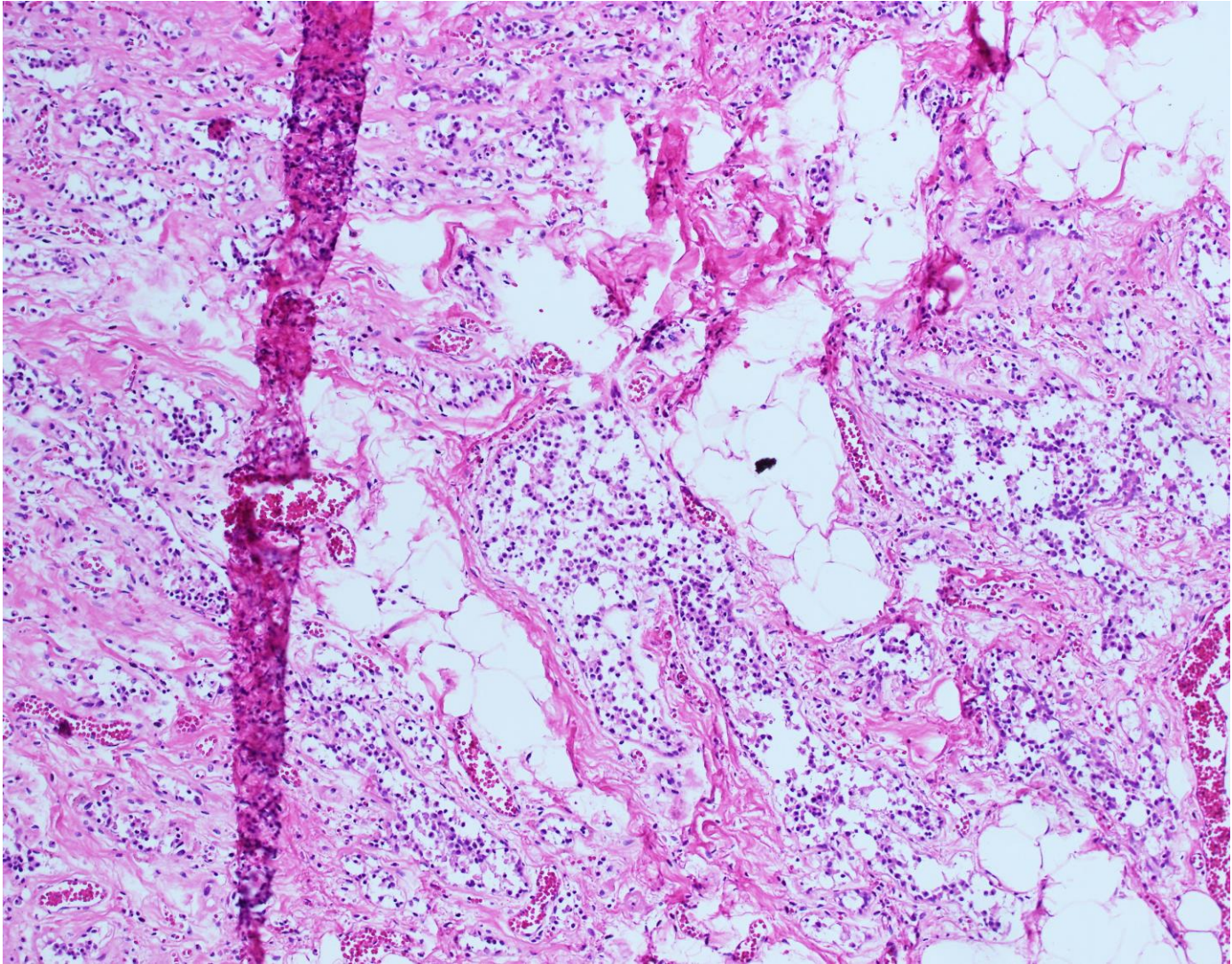
Nucleoli are stained too

QCmarkers

- Characteristics able objectively measured and evaluated
- Indicators of performance of fixation and tissue processing

**Tissue Section
Quality**

poor section



ใบนำส่งงาน (Slide H&E) ให้แพทย์

03-Sep-17

PC

ลำดับ

LAB NO.

หมายเหตุ

ประเมินคุณภาพสไลด์

1

HI-17-004098

2

S-60-030077

3

4

5

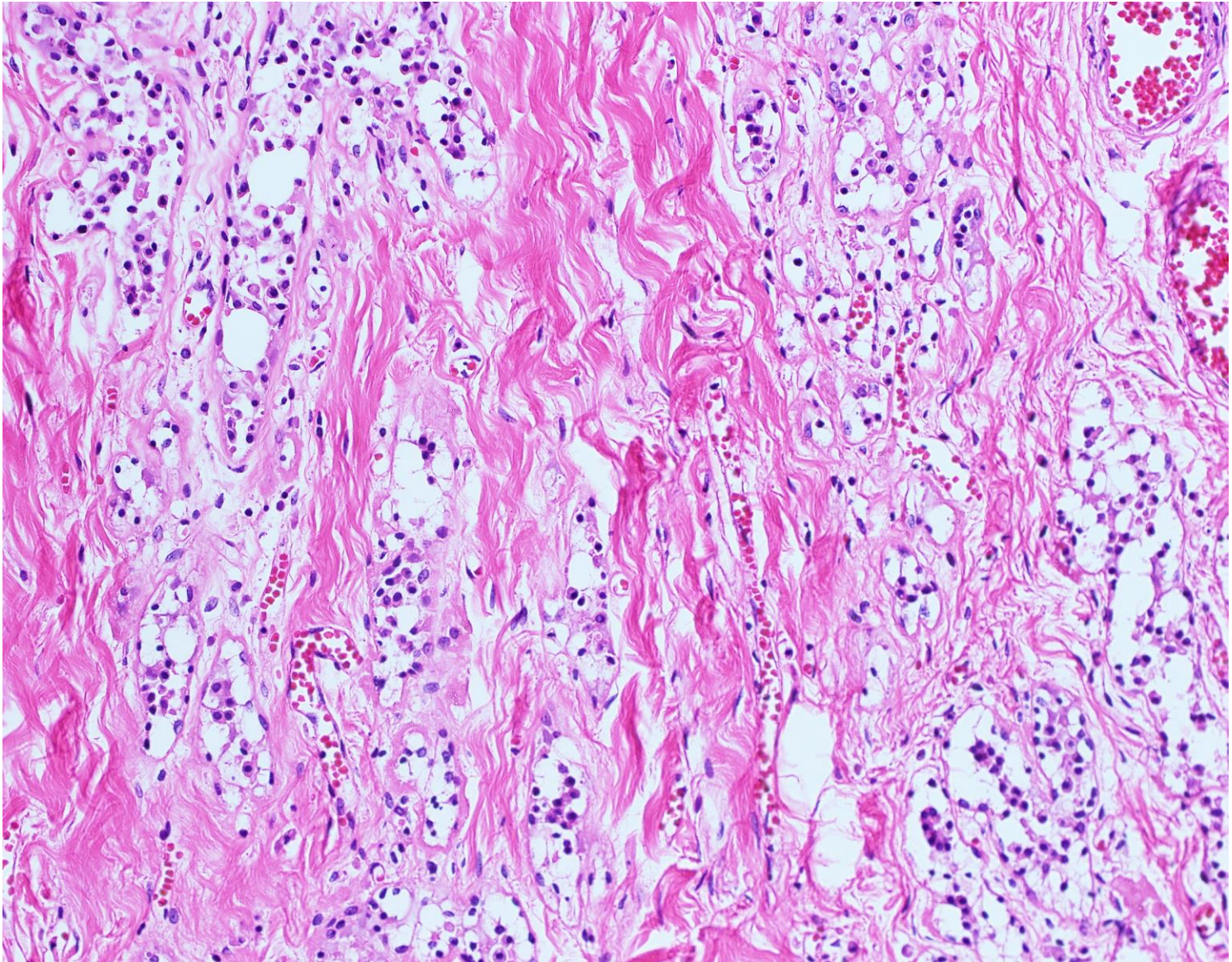
ผู้รับงาน

ผู้ส่งงาน

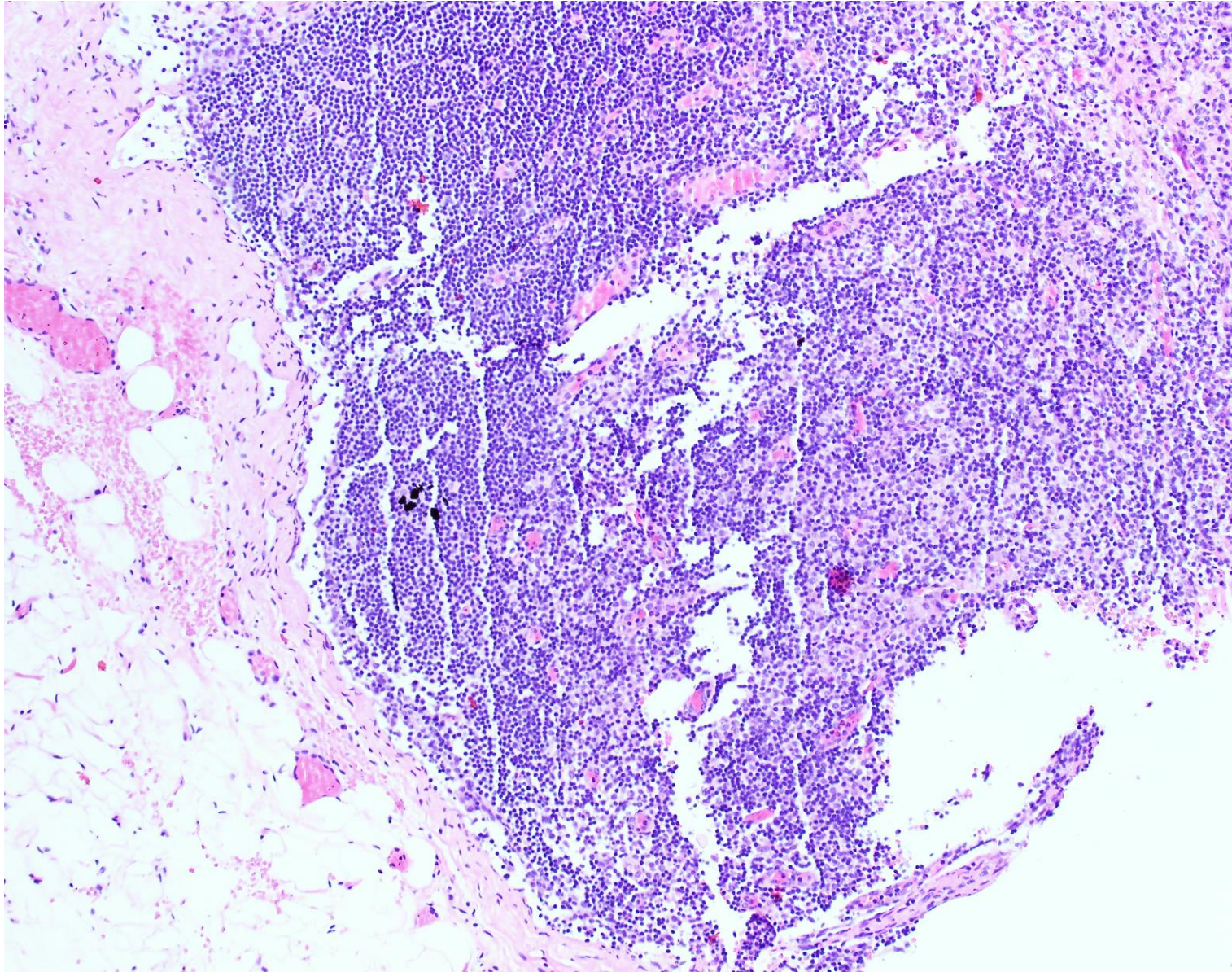
ระดับคะแนน

5 = ดีมาก 4 = ดี 3 = ปานกลาง
2 = พอใช้ 1 = ปรับปรุง

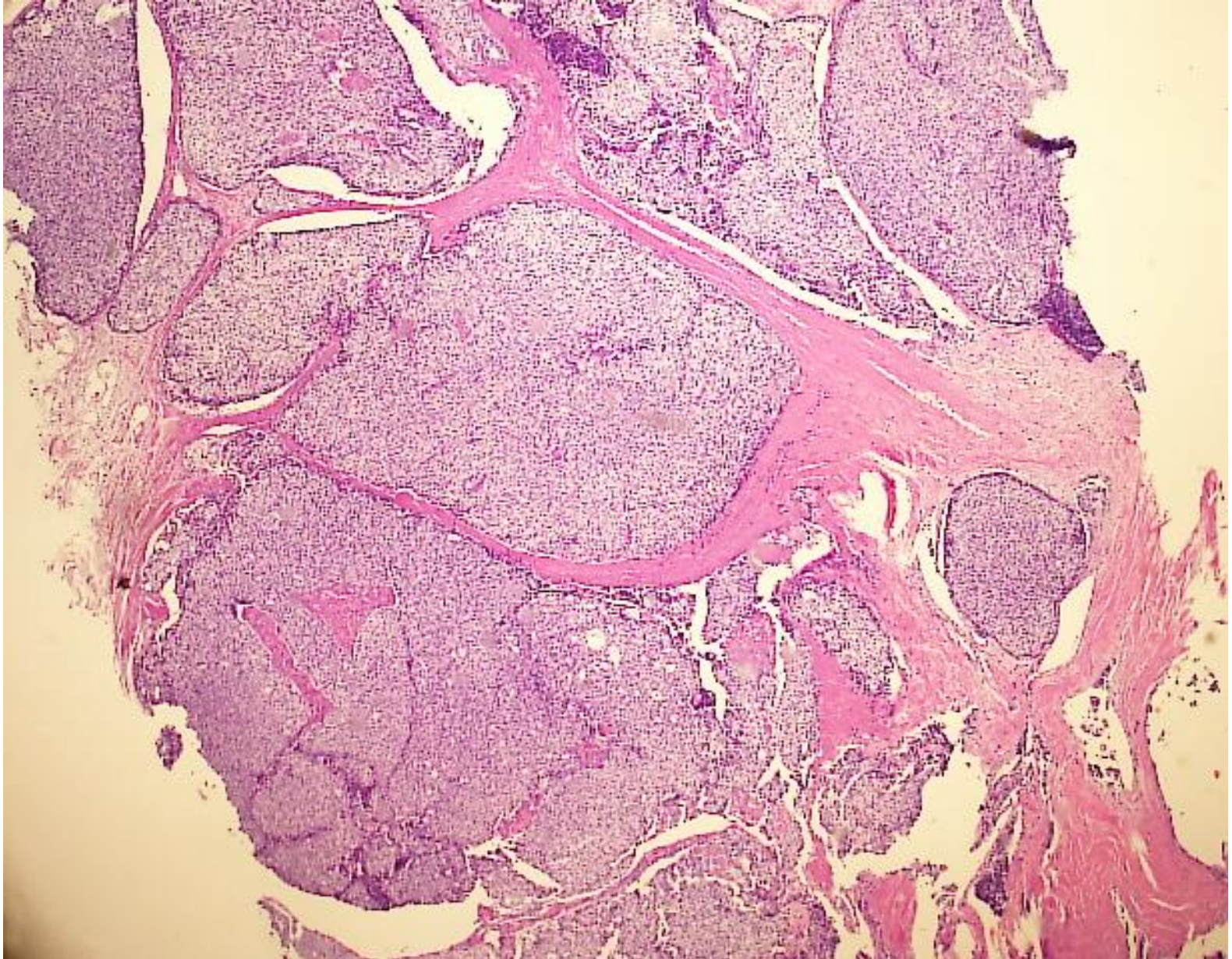
Slide Q1



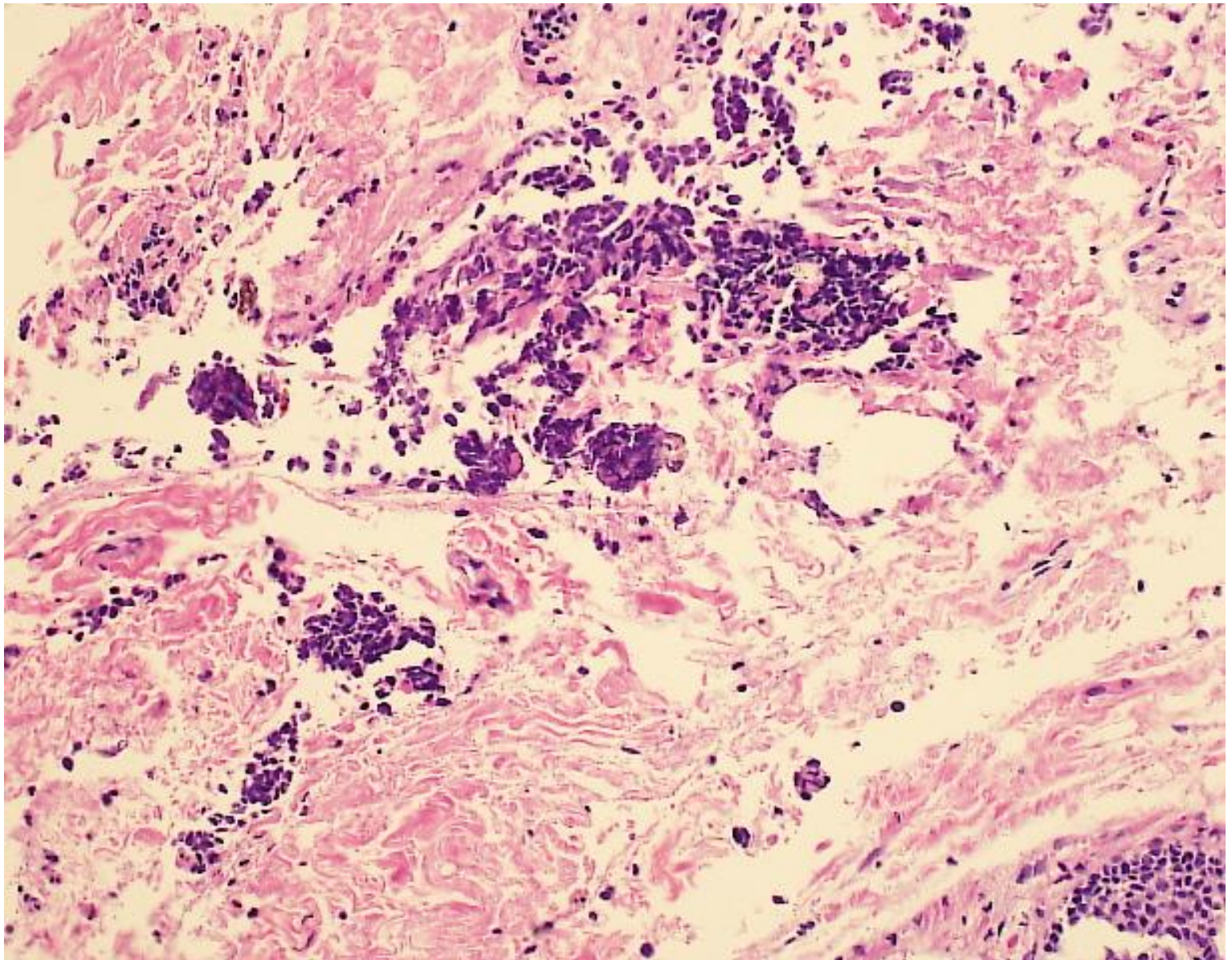
Slide Q2



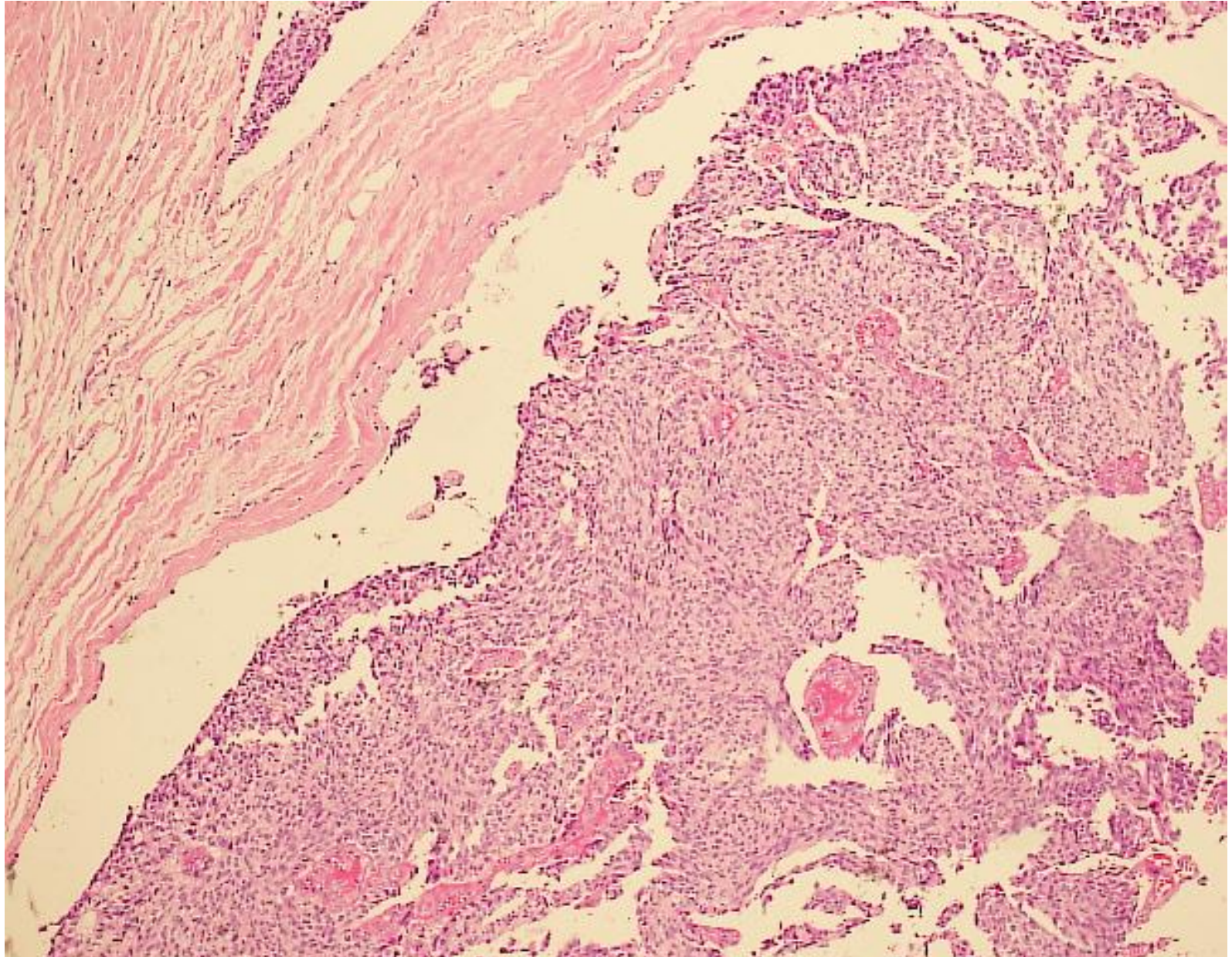
Slide Q3



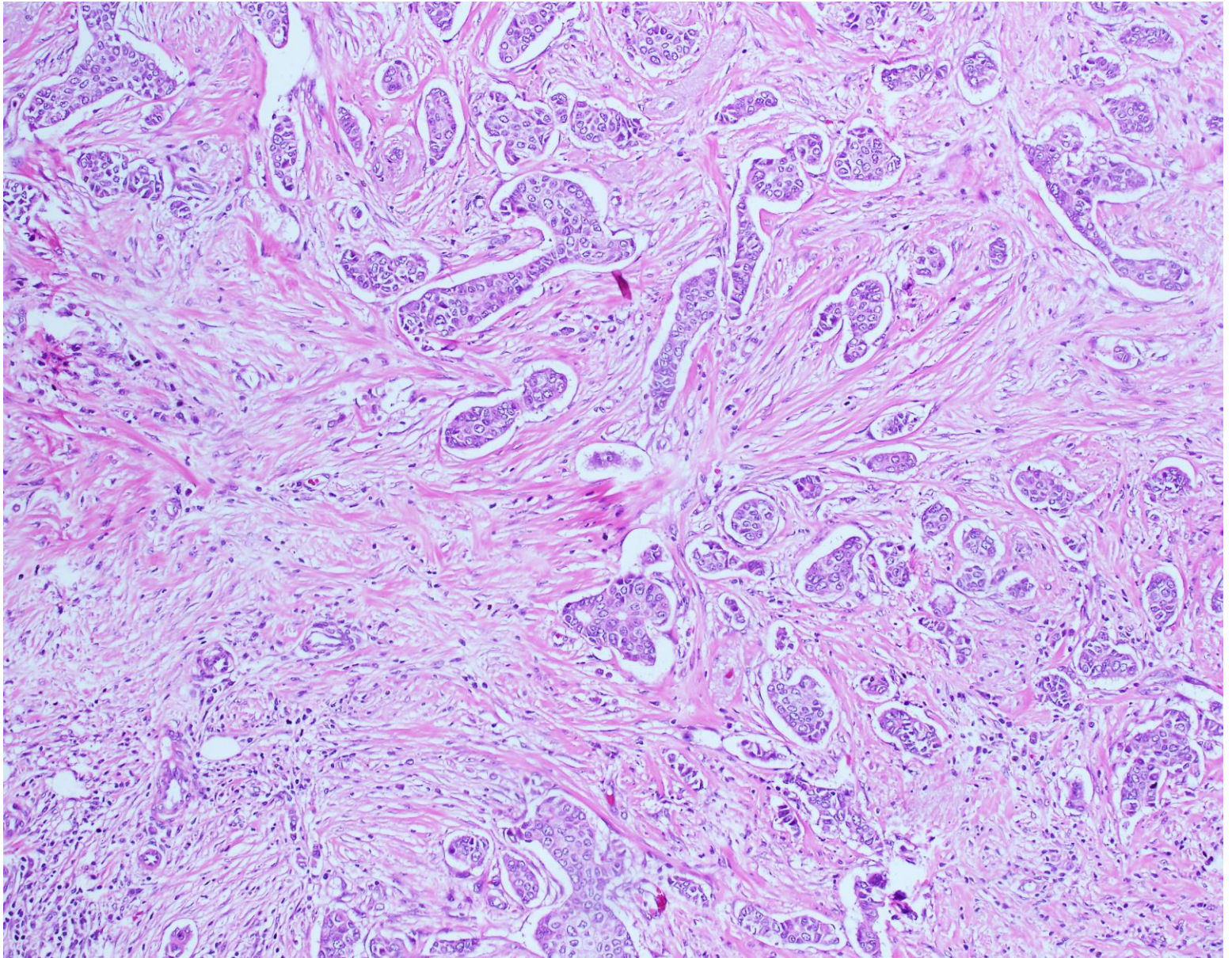
Slide Q4



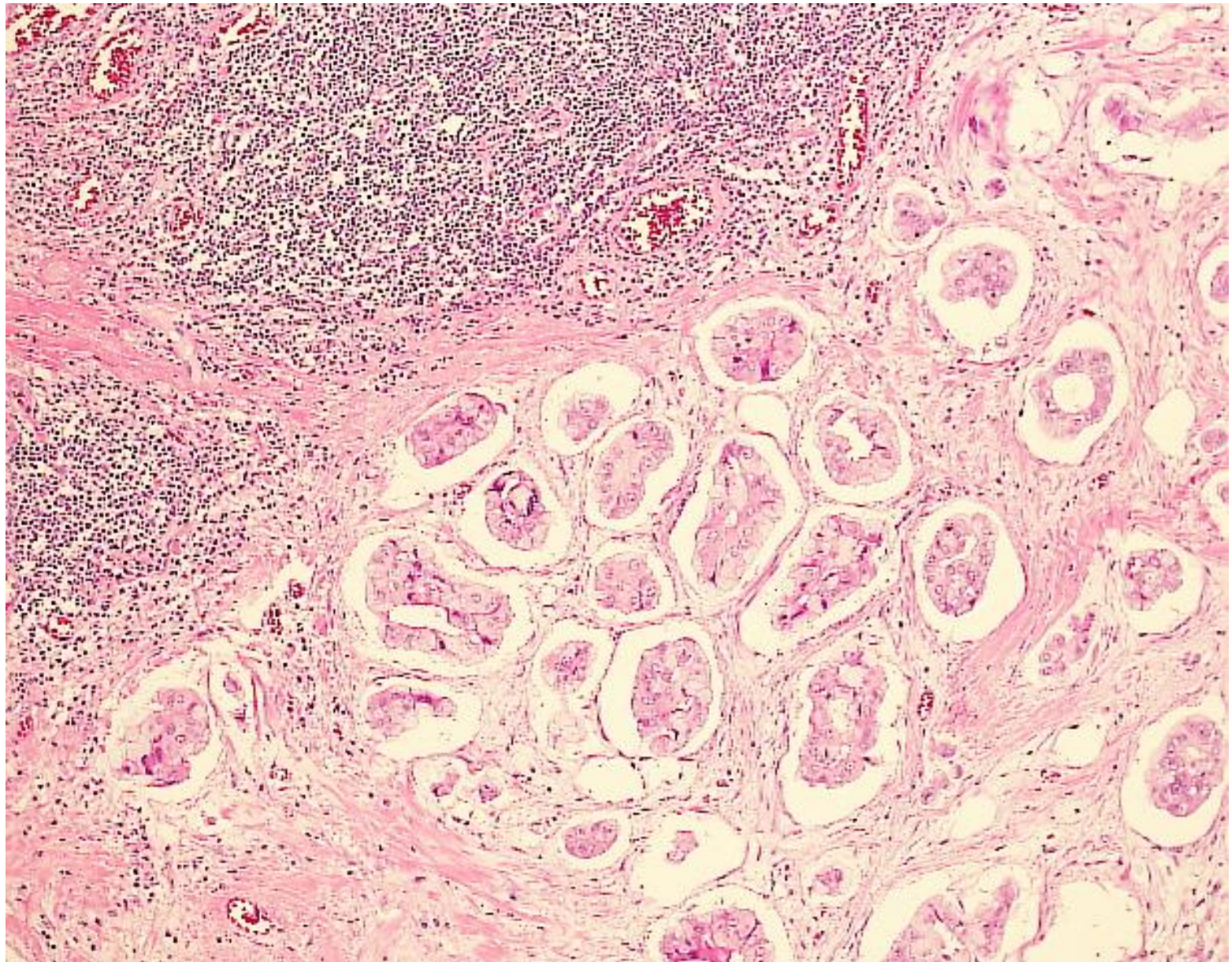
Slide Q5



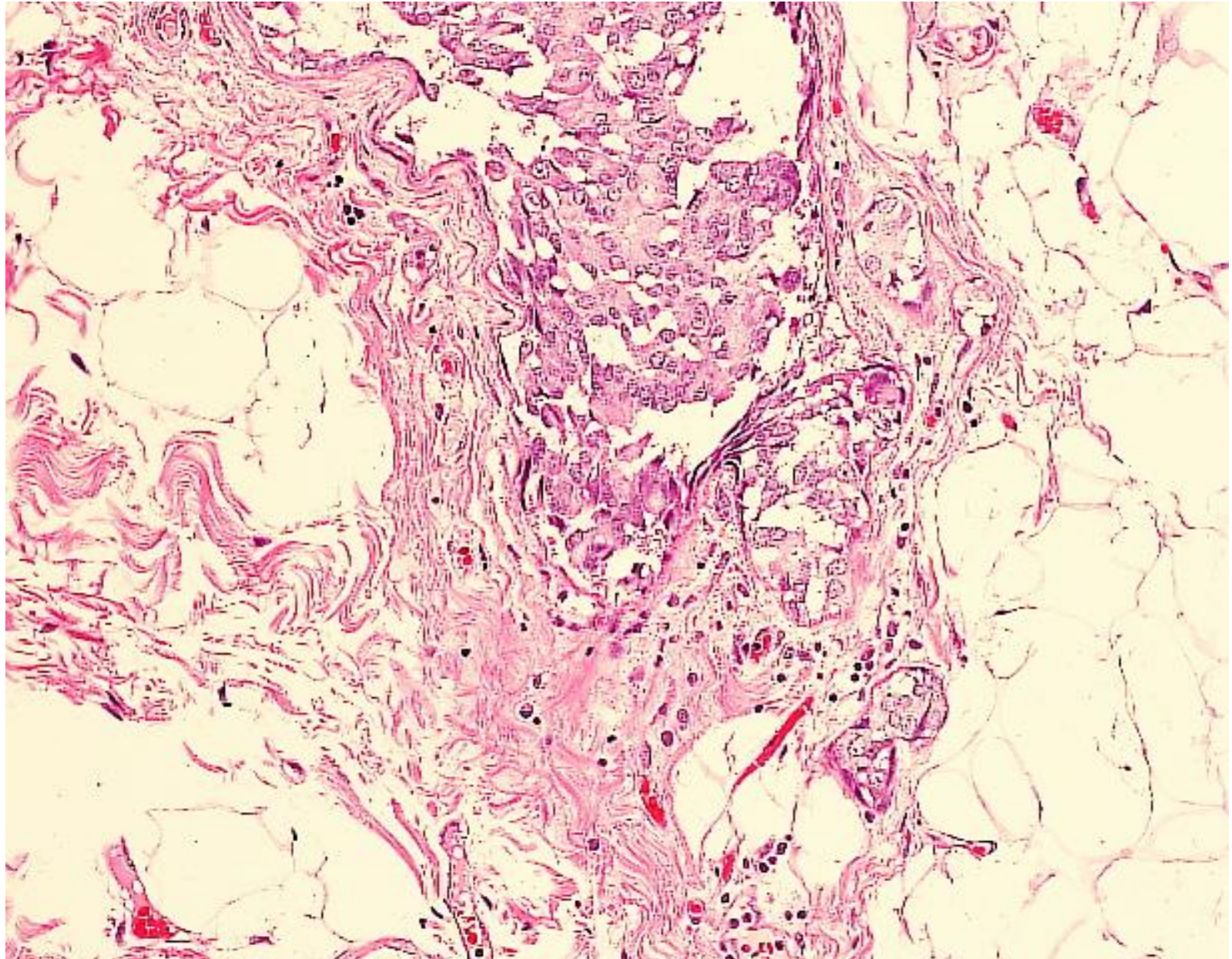
Slide 06



Slide Q7



Slide Q8





ราชวิทยาลัยพยาธิแห่งประเทศไทย

แก้ไขครั้งที่ 2
ประกาศใช้
8 กันยายน 2560

รหัสเอกสาร AP-01-02

แบบสำรวจเพื่อการรับรองมาตรฐานทางวิชาการของห้องปฏิบัติการ : สาขาพยาธิวิทยากายวิภาค

หน่วยงานที่ขอรับรอง

11.6	มีการเปลี่ยนน้ำยาใน tissue processor ตามระยะเวลาที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับความถี่ในการใช้งาน หรือปริมาณงาน และมีการบันทึกไว้เป็นหลักฐาน				บันทึกการเปลี่ยนน้ำยา
11.7	มีการปรับอุณหภูมิของ paraffin dispenser ให้เหมาะสมกับชนิดของพาราฟินที่ใช้				บันทึกการปรับอุณหภูมิ
11.8	มีการตรวจวัดอุณหภูมิใน paraffin dispenser ทุกครั้งที่ใช้งานและมีการบันทึก				บันทึกการปรับอุณหภูมิ
11.9	มีการประเมินคุณภาพสไลด์ H&E โดยพยาธิแพทย์และนำมาผลประเมินมาพัฒนาการทำงาน				ผลการประเมินคุณภาพ
11.10.	มีการตรวจวัดอุณหภูมิใน floatation bath ทุกครั้งที่ใช้งานและมีการบันทึก				บันทึกอุณหภูมิ
11.11	มีกระบวนการป้องกันการปนเปื้อนของ paraffin section ที่ลอยใน floatation bath				ประเมินผลงาน
Histochemistry		Y	N	NA	หลักฐานการปฏิบัติ
11.12	การย้อม histochemistry ทุกครั้ง มีการใช้ positive control ในทุกวิธีการย้อม และมีระบบควบคุมคุณภาพ				ประเมินผลงาน
11.13	มีคู่มือการปฏิบัติงาน ระเบียบวิธีการและชนิดของการย้อมพิเศษต่างๆ ที่ใช้อยู่ปัจจุบัน				คู่มือการปฏิบัติงานฉบับปัจจุบัน



ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย

แก้ไขครั้งที่ 2
ประกาศใช้
8 กันยายน 2560

รหัสเอกสาร AP-01-02

แบบสำรวจเพื่อการรับรองมาตรฐานทางวิชาการของห้องปฏิบัติการ : สาขาพยาธิวิทยากายวิภาค

หน่วยงานที่ขอรับรอง

น้ำยาสีย้อม		Y	N	NA	หลักฐานการปฏิบัติ
5.17	มีการเก็บน้ำยาตามคำแนะนำของผู้ผลิต				ประเมินผลงาน
5.18	น้ำยาและสารเคมีต่างๆ ต้องมีฉลากกำกับ ประกอบด้วยข้อมูลต่อไปนี้				ประเมินผลงาน
	1. ชื่อน้ำยา หรือสารเคมี ปริมาณ และความเข้มข้น (ถ้ามี)				
	2.วันที่เตรียมโดยห้องปฏิบัติการ				
	3.วันหมดอายุ(ถ้ามี) สารเคมีที่เปิดใช้แล้ว มีผลให้วันหมดอายุเปลี่ยนไป ให้บันทึกวันหมดอายุให้ชัดเจน				
5.19	ในการย้อมสีมีการประเมินสีย้อมทุกวัน				บันทึกผลการประเมิน
5.20.	ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เครื่องย้อมสีอัตโนมัติ ต้องมีการกรองสีอย่างสม่ำเสมอ				บันทึกผลการปฏิบัติงาน
5.21	มีการเปลี่ยนสีย้อมตามระยะเวลาที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับความถี่ในการใช้งาน หรือปริมาณงานและมีการบันทึกไว้เป็นหลักฐาน				บันทึกการปฏิบัติงาน
5.22	มีการประเมินคุณภาพของสไลด์ว่าดีเพียงพอในการวินิจฉัยโรค				บันทึกการประเมิน
5.23	ภาชนะบรรจุน้ำยาและสีย้อมทุกชนิดมีการติดฉลากอย่างถูกต้อง				ประเมินผลงาน
5.24	ภาชนะที่ใส่สีย้อมมีฝาปิดตลอดเวลาที่ไม่ได้ใช้งาน				ประเมินผลงาน
5.25	สีหรือน้ำยาที่หมดอายุ หรือไม่มีการกำหนดวันหมดอายุ สามารถใช้งานได้โดยการตรวจสอบคุณภาพกับสไลด์ control ก่อนนำมาใช้จริง				บันทึกผลการประเมิน

good ribbon

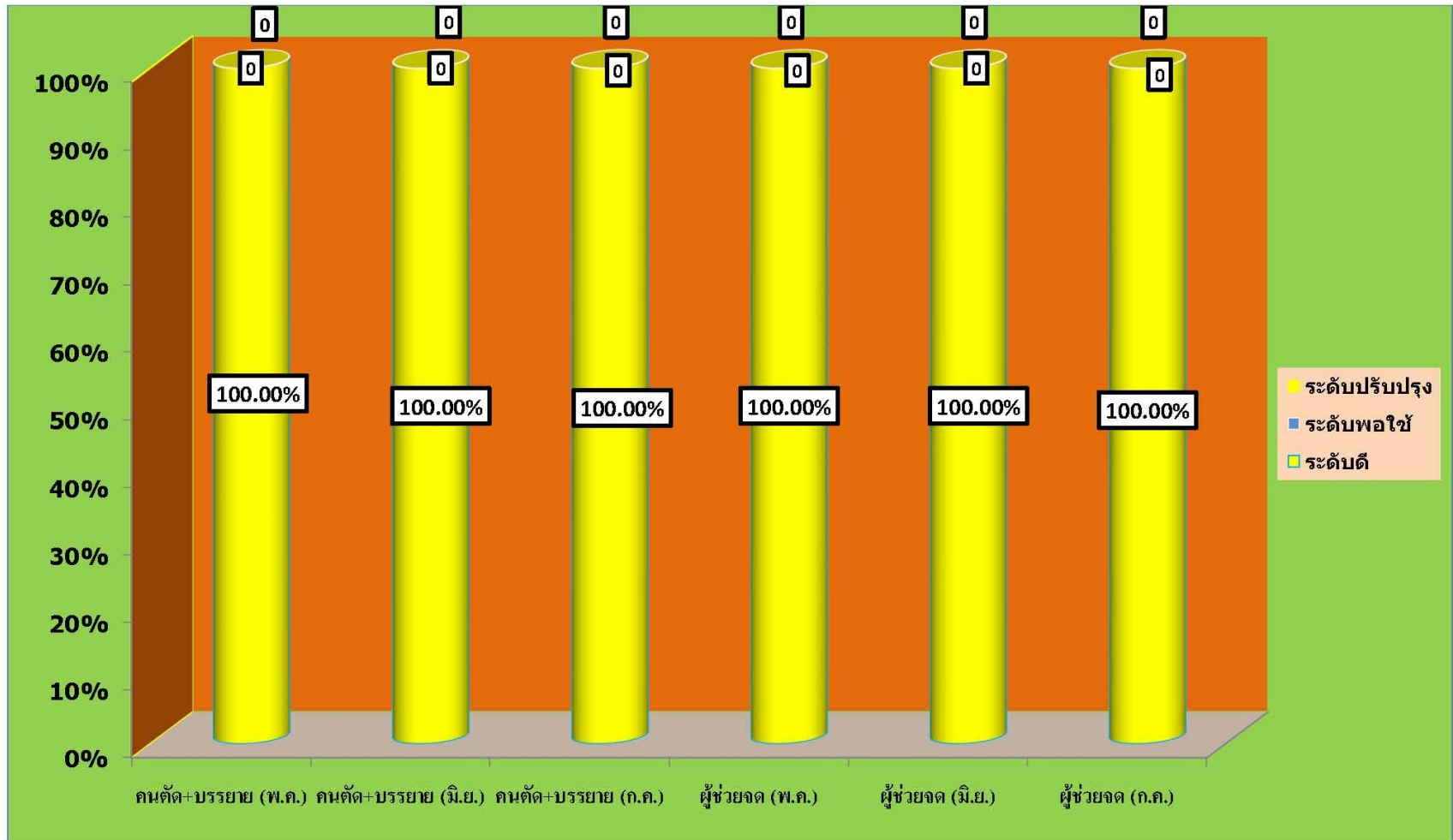


poor ribbon



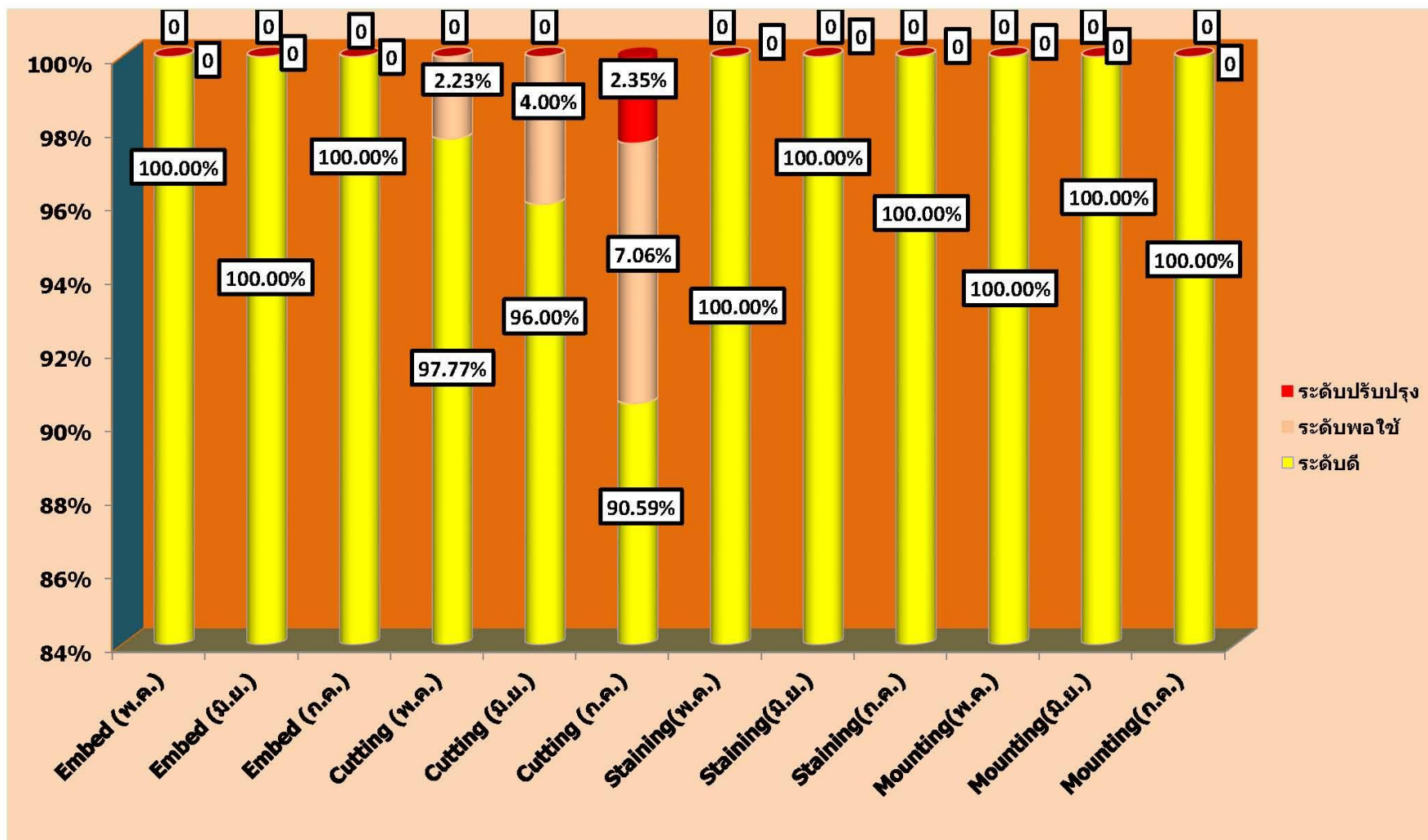
สรุปการรายงานระดับคุณภาพสไลด์ทางพยาธิวิทยา

พฤษภาคม – กรกฎาคม 2560



สรุปการรายงานระดับคุณภาพสไลด์ทางพยาธิวิทยา

พฤษภาคม – กรกฎาคม 2560





ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย

แก้ไขครั้งที่ 2

ประกาศใช้

8 กันยายน 2560

รหัสเอกสาร AP-01-02

แบบสำรวจเพื่อการรับรองมาตรฐานทางวิชาการของห้องปฏิบัติการ : สาขาพยาธิวิทยากายวิภาค

หน่วยงานที่ขอรับรอง

14. Immunohistochemistry (ขอข้อมูลเพิ่มเติมจาก อ.ทรงคุณ)		Y	N	NA	หลักฐานการปฏิบัติ
14.1	มีคู่มือการปฏิบัติงาน ระบุวิธีการและชนิดของ antibody ต่างๆ ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน				เอกสารวิธีปฏิบัติ
14.2	ในกรณีที่มีการย้อม immunohistochemistry ในสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่ formalin fixed paraffin embedded tissue ต้องมีคู่มือการใช้งานที่เหมาะสมสำหรับสิ่งส่งตรวจเหล่านั้น เช่น frozen section, air-dried imprint, cytocentrifuge or liquid-based preparation, decalcified specimen, tissue fixed in other fixatives				เอกสารวิธีปฏิบัติ
14.3	ในกรณีที่ไม่ได้ย้อมด้วยเครื่องอัตโนมัติ ต้องมีการตรวจสอบค่า pH ของ buffer อย่างสม่ำเสมอ				บันทึกผลการวัด pH
14.4	มีการทำ positive control สำหรับ antibody แต่ละตัว				ประเมินผลงาน
14.5	มีการทำ negative control ในกรณีที่จำเป็น				ประเมินผลงาน
14.6	ถ้าห้องปฏิบัติการใช้ avidin-biotin complex (ABC) detection system หรือระบบอื่นที่ใกล้เคียง เช่น streptavidin biotin หรือ neutravidin-biotin ต้องมีนโยบายที่กล่าวถึง nonspecific false positive staining ที่เกิดจาก endogenous biotin และมีการทำ negative-reagent control ในการย้อมทุกครั้ง				
14.7	มีระบบตรวจสอบสไลด์ control ทุกแผ่นที่ย้อมพร้อมกันกับ testing slide ในแต่ละวัน และบันทึกไว้เป็นลายลักษณ์อักษรไว้อย่างน้อย 1 ปี				บันทึกผลการตรวจสอบ
14.8	มีวิธีปฏิบัติในการคัดเลือกชิ้นเนื้อเพื่อทำ positive control				เอกสารวิธีปฏิบัติ
14.9	ห้องปฏิบัติการมีการบันทึกผลการประเมิน antibody ตัวใหม่ก่อนจะนำไปใช้				บันทึกผลการประเมิน
14.10	มีการประเมิน antibody lot ใหม่เปรียบเทียบกับ lot เก่าทุกครั้งโดยใช้ชิ้นเนื้อ block เดียวกัน ก่อนจะนำมาใช้ และบันทึกไว้				บันทึกผลการประเมิน
14.11	มีการประเมินคุณภาพสไลด์และนำผลการประเมินมาพัฒนาการทำงาน				บันทึกการพัฒนาการทำงาน



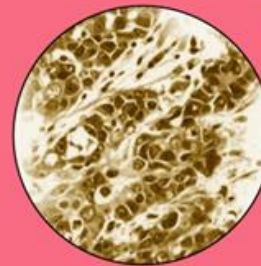
บริษัท ไฮเทค แล็บ จำกัด
HI-TECH LAB CO., LTD.

แบบประเมินคุณภาพการย้อมสีสไลด์

Lab No. 5-60-28536 A

วันที่	รายการ	ตัวอย่าง	การติดสี			คุณภาพ สไลด์	หมายเหตุ
			ดี	ปานกลาง	ปรับปรุง		
4/9/60	<input type="checkbox"/> H&E stain <input type="checkbox"/> Histochemistry <input checked="" type="checkbox"/> Immunohistochemistry <input type="checkbox"/> Molecular <input type="checkbox"/> In situ Hybridization	ER PR HER-2 Ki67					

พยาธิแพทย์ _____



PRE-ANALYTICAL
INTERFERENCE

V
a
l
i
d
H
E
R
2

Tissue Fixation:

Summary of Best Practices

- ▶ Poor breast tissue fixation is a common source of error in HER2 testing¹
- ▶ Breast specimens should be placed in formalin fixative *within 1 hour* of collection²
- ▶ Prolonged ischemic time may compromise the integrity of the HER2 test¹
- ▶ Delay to formalin fixation may invalidate HER2 FISH test results by leading to undercounting the HER2 signal¹
- ▶ Time to fixation should be recorded on the pathology report for each breast tissue sample²

1. Khoury T, et al. *Mod Pathol*. 2009;22:1457-1467.

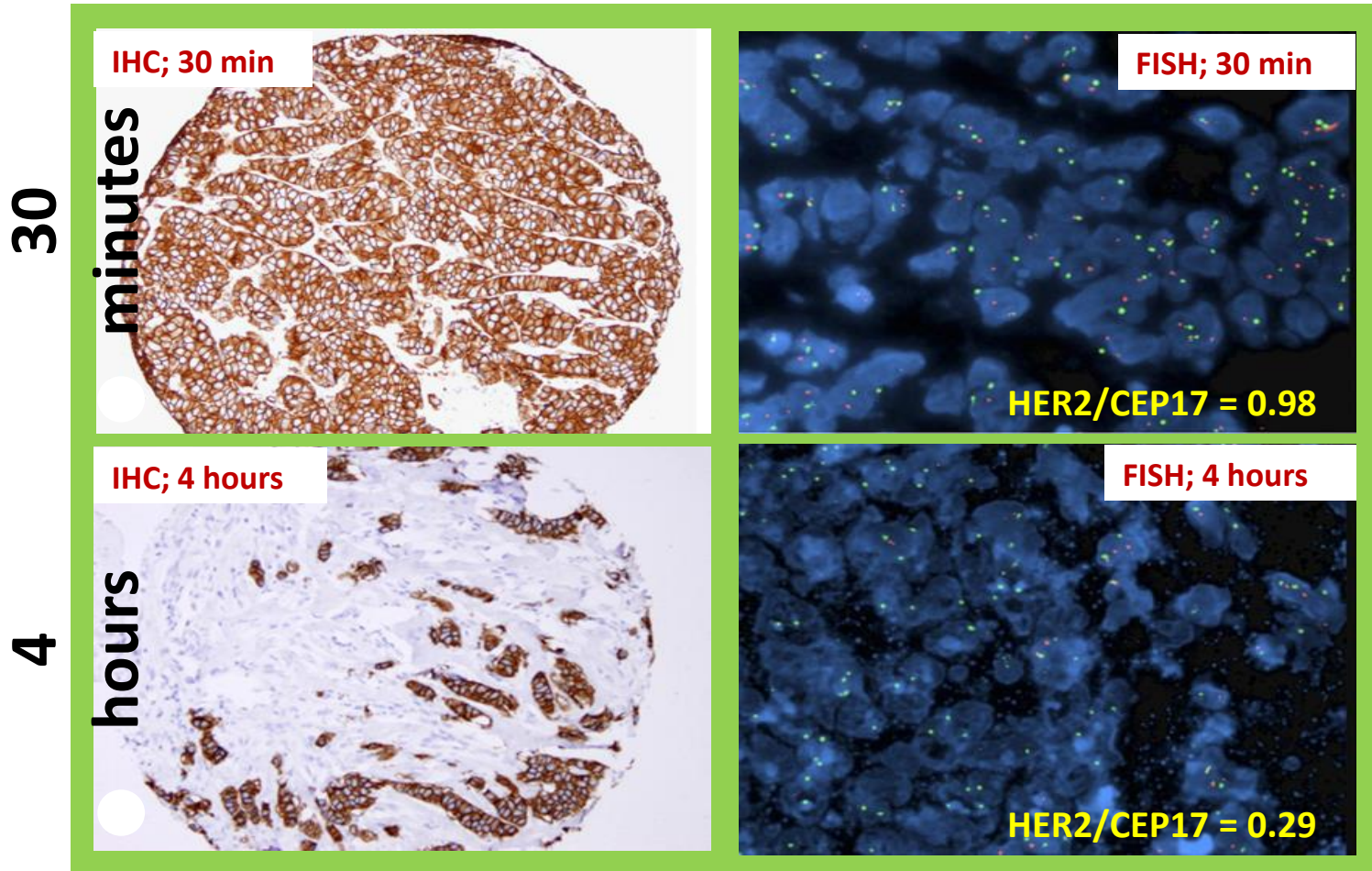
2. Wolff AC et al. *J Clin Oncol*. 2013; Oct 7. [Epub ahead of print]

Preanalytical Variables:

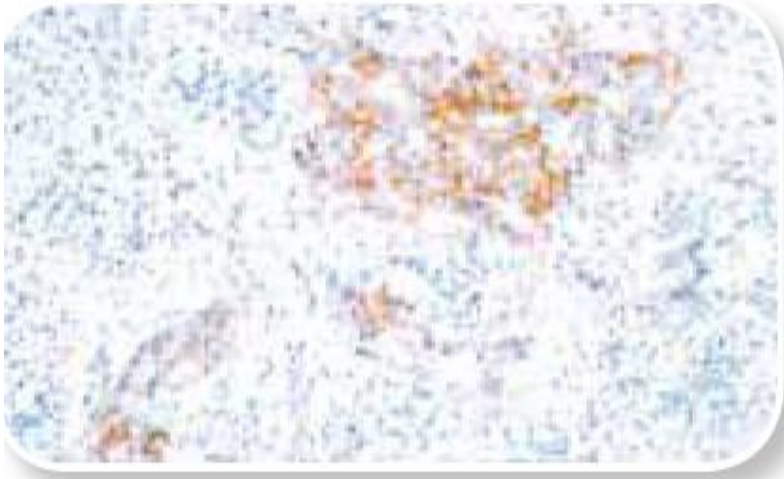
Tissue Fixation

- ▶ Breast tissue samples should be fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin for 6 hours to 72 hours before processing¹
- ▶ Breast core biopsy samples may not be optimal in some situations
 - ◆ Under- or overfixation of tissue may compromise the accuracy of the HER2 test
 - ◆ Duration of fixation should be recorded on the pathology report for each sample
- ▶ Misconception: Smaller breast biopsy samples will fix more quickly than large specimens and therefore require less time in formalin^{2,3}
 - ◆ Formalin will penetrate more quickly into smaller samples, but tissue fixation is a chemical reaction that takes time (“clock” reaction)
 - ◆ Small biopsy samples require the same amount of fixation time as larger resection samples

Importance of Time-to-Fixation on HER2 IHC and FISH Testing



Under- or Over-fixation of Breast Tissue May Compromise HER2 Test Accuracy



Breast carcinoma
shows 2+ staining
with the
appropriate fixation
time



Breast carcinoma
shows negative
staining after
extended fixation
time

DURATION of FIXATION



Acceptable
fixation time is
6-72 h.



too short



acceptable



too long

Take Home Message

- IHC – ER, PgR, HER2 and Ki67 are essential biomarkers for all breast carcinoma
- Gene Expression Profiling is biomarker that help planning whether hormonal Rx alone or combined hormonal and chemo Rx
- In addition to pre-analysis, tissue and laboratory process, critical values with refinement are key for analytical validity

Take Home Message

- Section quality reflects performance in pre-analysis and tissue processing.
- Section quality assessment needs objective and relevant criteria.
- Section quality affects primarily histological diagnosis and classification.
- Section quality is basic for accurate biomarkers testings.