

การประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะ HER2 โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization ด้วยหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018 Assessment of concordance in *HER2* status using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique according to the ASCO/CAP 2013 and 2018 guidelines

กานต์ธิดา แจ้งยุบล¹ จุฑามาศ ยิ้มนุ่น¹ สมบูรณ์ กิตติคงวัตร² บงกช เพ็ชรรัตน์¹ ปรียวดี เหราบัตย์¹ และ ทิวารัตน์ สินธุวิวัฒน์^{1*}
Kanthida Jangyubol¹ Jutamas Yimnoon¹ Somboon Kittikongwat² Bongkod Petcharat¹ and Priyavudh Herabutya¹
Thivaratana Sinthuwiwat^{1*}

บทคัดย่อ

ยีน Human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) มีบทบาทสำคัญในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ซึ่งมักจะพบการแสดงออกที่มากเกินไปหรือพบการเพิ่มจำนวนชุดของยีนนี้ ประมาณร้อยละ 15 – 20 ของผู้ป่วย ซึ่งวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการตรวจสอบ นำผลไปใช้พยากรณ์ภาวะโรค ช่วยแพทย์วางแผนในการรักษา และเลือกใช้ยาเคมีบำบัดในการรักษามะเร็งเต้านมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปี 2018 The American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) ได้มีแนวทางการการจัดกลุ่มสถานะ *HER2* แบบปรับปรุงใหม่จากปี 2013 โดยพยายามลดจำนวนรายที่ให้ผลแบบกำกวม (equivocal) เนื่องจากการรักษาแบบ Anti-*HER2* therapy ในรายที่มีผลแบบกำกวม ให้ผลที่ไม่แน่นอน และในปี 2023 ทาง ASCO/CAP ได้มีการทบทวนแนวทางการการจัดกลุ่มสถานะ *HER2* มีข้อสรุปว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลักเกณฑ์และยืนยันการใช้หลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ปี 2018 ในการจัดกลุ่มสถานะ *HER2* ในการศึกษาที่ผู้วิจัยจึงศึกษาประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH ด้วยหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018 ว่าสอดคล้องกันหรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางในการลดจำนวนรายที่มีผลแบบกำกวม ที่ส่งตรงมายังห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นยังเปรียบเทียบการกำหนดสถานะของ *HER2* ด้วยจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการนับและรายงานผลของเทคนิค FISH ยังเป็นที่ถกเถียง ซึ่งผลการวิจัยพบว่าจาก 75 ตัวอย่าง เมื่อประเมินสถานะของ *HER2* ด้วยหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018 มีความสอดคล้องกันถึง 71 ราย คิดเป็น 94.67% ที่ผลไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อคำนวณค่าความสอดคล้องโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ (kappa) มีค่าเท่ากับ 0.8886 แสดงว่าการแปลผลโดยใช้ ASCO/CAP Guideline 2013 และ 2018 มีความสอดคล้องกันมาก และมีรายที่ผลเปลี่ยนแปลงจากผลแบบกำกวม 2 ตัวอย่างคิดเป็น 2.67% ที่ถูกจัดกลุ่มเป็น negative ทำให้ง่ายต่อการวางแผนในการรักษาได้ และการอ่านผลเปรียบเทียบ 200 เซลล์ และ 60 เซลล์ โดยใช้ ASCO/CAP 2018 พบว่ามีถึง 70 ราย (93.33 %) ที่แม้จะลดจำนวนเซลล์ที่ใช้อ่านน้อยลงแต่ไม่กระทบต่อผลการวิเคราะห์สถานะ *HER2* ถึงแม้ว่าจะมี 5 ราย (6.67 %) ที่มีการเปลี่ยนแปลงสถานะ แต่เมื่อพิจารณาจากค่าความสอดคล้องโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ (kappa) มีค่าเท่ากับ 0.8567 อยู่ในระดับความสอดคล้องมาก แสดงว่าการแปลผลโดยใช้ 200 เซลล์ หรือ 60 เซลล์ การกำหนดสถานะ *HER2* ไม่มีความแตกต่างกัน การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า ASCO/CAP 2018 สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับประโยชน์จากการรักษา และอาจช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ เฮอร์-ทู; ฟลูออเรสเซนซ์อินซิติวไฮบริไดเซชัน; แอสโก/แคพ; มะเร็งเต้านม

¹ งานห้องปฏิบัติการวิจัยโครโมโซม สำนักบริหารวิจัยและนวัตกรรม ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์, ประเทศไทย

² สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ประเทศไทย

¹ Cytogenetics Research Laboratory, Bureau for Research and Innovation Management, Chulabhorn Royal Academy, Thailand

² Institute of Pathology Ministry of Public Health, Thailand

*Corresponding Author: e-mail: thivaratana.sin@cra.ac.th

Abstract

The human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene plays a crucial role in breast cancer. Most breast cancer patients found overexpression of the *HER2* protein or *HER2* amplification in 15–20% of invasive breast cancers. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is regarded as a standard method for determining the abnormality of *HER2* overexpression in breast cancer. Assessment of *HER2* status is an essential step for prognosis, managing the treatment, and choosing chemotherapy for breast cancer efficacy. In 2018, the American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) was an improved version for testing *HER2* in breast cancer in 2013. They try to decrease equivocal *HER2* cases because equivocal case results are challenging for clinical treatment. After all, anti-*HER2* therapy in equivocal patients is always unpredictable. Furthermore 2023, there will be ASCO-CAP *HER2* testing guideline updates and no changes in the 2018 ASCO-CAP recommendations. This update affirms the 2018 ASCO-CAP guideline recommendations. This research assesses the concordant *HER2* status using the FISH technique within the ASCO/CAP guideline between 2013 and 2018. Moreover, this research needs to compare *HER2* status between different numbers of cells because the number of cells that should be counted and reported in this technique is controversial. The result found that in 71 cases (94.67%) of 75 cases, the *HER2* status using the FISH technique within the ASCO/CAP guideline between 2013 and 2018 was concordant with 0.8886 kappa with showing a strong of not difference between *HER2* status from both guidelines. Furthermore, 2 of 75 samples (2.67%) changed from equivocal to negative, making it easy to decide on treatment management. Moreover, the results of the number of cells for analysis between 200 and 60, followed by ASCO/CAP 2018, are similar, and we found 70 cases (93.33 %) in which decreasing the analyzed cell number did not affect the *HER2* status. Even with a reduced number of cells used for analysis, the *HER2* status interpretation was not affected. Although there were 5 cases (6.67%) with a change in status, but when looking at the kappa, it still shows strong concordant at 0.8567, indicates a high level of concordance. This study can conclude that our laboratory can use the ASCO/CAP 2018 guideline for FISH analysis, allowing the patient to receive potential treatment and reducing laboratory analysis time.

Keywords: *HER2*; FISH; ASCO/CAP; breast cancer

หลักการและเหตุผล

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบได้มากในผู้หญิงทั่วโลก และมะเร็งเต้านมยังเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้หญิงทั่วโลกอีกด้วย Arnold et al. (2022) นอกจากนี้จากสถิติมะเร็งเต้านมในประเทศไทยในปี 2565 พบว่ามะเร็งเต้านมมีสถิติพบมากเป็นอันดับที่ 1 ในผู้หญิง (23.2%) และพบเป็นอันดับที่ 3 จากโรคมะเร็งทั้งหมดในทั้งผู้ชายและผู้หญิง (11.8%) ทั้งยังมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้นทุกปี Bray et al. (2024)

ทั้งนี้งานห้องปฏิบัติการโครโมโซม ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ เปิดรับบริการการตรวจหาความผิดปกติของยีน

HER2 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ซึ่งยีน *HER2* หรือ Human epidermal growth factor receptor 2 นั้นเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม 17q12 ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมักจะตรวจพบการแสดงออกที่มากเกินไป (Overexpression) ของโปรตีน *HER2* ซึ่งสร้างจากยีน *HER2* หรือพบการเพิ่มจำนวนชุดของยีนนี้ (Amplification) ซึ่งสามารถพบได้ประมาณร้อยละ 15–20 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม Gordian-Arroyo et al. (2019) การตรวจหาความผิดปกติของยีน *HER2* ที่แสดงออกมากเกินไปในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม สามารถ

ตรวจสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) หรือ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นต้น การตรวจหาการแสดงออกของยีนมะเร็ง *HER2* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมสามารถนำไปใช้พยากรณ์ภาวะของโรคและเป็นหนึ่งในวิธีการที่จะนำมาประกอบการตัดสินใจในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพื่อช่วยแพทย์วางแผนในการรักษาและเลือกใช้ยาเคมีบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบัน ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงออกของยีน *HER2* มากเกินไปมีการตอบสนองต่อการรักษาแบบ Targeted therapy (Anti-*HER2* therapy) ทำให้อัตราการรอดชีวิตจากมะเร็งชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น Slamon et al. (2001) and Wynn and Tang (2022) The American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) ได้มีแนวทางเกี่ยวกับการทดสอบยีน *HER2* ในมะเร็งเต้านม โดยมีแนวทางฉบับแรก ในปี 2007 และต่อมาในปี 2013 ได้มีการปรับปรุงแนวทางการทดสอบ *HER2* ในมะเร็งเต้านมโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพัฒนาเพื่อยืนยันการตรวจการวิเคราะห์ *HER2* ให้ถูกต้องและการใช้ประโยชน์ทางคลินิกของ *HER2* ในการวางแผนการรักษาเพื่อตอบสนองต่อการรักษาแบบมุ่งเป้าต่อโปรตีน *HER2* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ Wolff et al. (2013) เนื่องจากการรักษาแบบ Anti-*HER2* therapy ในรายที่มีผลแบบก้ำกึ่ง ให้ผลที่ไม่แน่นอน ดังนั้นในปี 2018 (The 2018 ASCO/CAP guideline) ได้มีแนวทางการทดสอบแบบปรับปรุงใหม่โดยพยายามจะลดจำนวนรายที่ให้ผลแบบก้ำกึ่งลง โดยการจัดกลุ่มจากผลทั้ง IHC และ FISH Wolff et al. (2018) และจากการศึกษาของ Crespo et al. (2020) พบว่า เมื่อใช้หลักเกณฑ์ปี 2018 สามารถจัดกลุ่มให้กลุ่มที่มีผลแบบก้ำกึ่งได้ ซึ่งส่งผลต่อการจัดการการรักษาใหม่ ให้มีประสิทธิภาพและส่งผลทางคลินิกในระยะยาว แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาประเด็นนี้อย่างต่อเนื่องก็ยังจำเป็นเพื่อยืนยันผลทางคลินิกของหลักเกณฑ์ปี 2018 Gordian-Arroyo et al. (2019) ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสนใจที่จะทำงานวิจัยนี้มาเพื่อยืนยันและพัฒนางานประจำที่ทำอยู่ซึ่งใช้หลักเกณฑ์ปี 2013 เปลี่ยนมาเป็นปี 2018 นำมาทดสอบก่อนการใช้ในห้องปฏิบัติการจริงด้วย

ถึงแม้ว่า FISH เป็นหนึ่งเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบยีน *HER2* แบบจำเพาะเจาะจงในมะเร็งเต้านม แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการนับ

เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ทำได้ยังไม่ได้มีการกำหนดที่ชัดเจนและยังเป็นที่ถกเถียง ในส่วนทางห้องปฏิบัติการเดิมใช้จำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผล 200 เซลล์ ตามการศึกษา ของ Wolff et al. (2007) และ Wheeler et al. (2018) ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยจำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ผลสูงกว่าจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผลของการกำหนดสถานะของยีน *HER2* ตามหลักเกณฑ์ปี 2013 ของ Wolff et al. (2013) และปี 2018 ของ Wolff et al. (2018) ที่แนะนำจำนวนอย่างน้อย 20 เซลล์ เนื่องจากการครอบคลุมพื้นที่ของชิ้นเนื้อทั้งหมดอาจเกิดจาก heterogeneity ของ *HER2* expression ในแต่ละบริเวณของชิ้นเนื้อได้ อีกทั้งต่อมาทางห้องปฏิบัติการได้มีการเปลี่ยน probe ที่ใช้ เป็นของ Path-Vysion *HER2* DNA Probe Kit (Abbott) ซึ่งได้แนะนำ จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลจำนวน 20 เซลล์ ในกรณีที่ผู้วิเคราะห์ผลเป็นพยาธิแพทย์ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะปฏิบัติตามคำแนะนำของ ASCO/CAP guideline แต่ความไม่แม่นยำของการทดสอบ *HER2* ยังคงเป็นประเด็นที่เกี่ยวข้องทั้งเทคนิค IHC และ FISH Polonia et al. (2017)

จากการที่กล่าวมาข้างต้น ทีมผู้วิจัยจึงต้องการประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH ด้วยหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018 ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำมาใช้เป็นหลักเกณฑ์ใหม่ในการวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ และเปรียบเทียบการกำหนดสถานะของ *HER2* ด้วยการลดจำนวนเซลล์จาก 200 เซลล์ ลงเป็น 60 เซลล์ว่าการกำหนดสถานะมีความแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อได้จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งเต้านม เป็นโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยในผู้หญิงทั่วโลก Bray et al. (2018) สามารถรักษาให้หายได้ประมาณ 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มต้นหรือระยะที่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ในร่างกาย อย่างไรก็ตาม มะเร็งเต้านมในระยะลุกลามเป็นโรคที่สามารถรักษาได้ โดยเป้าหมายหลักในการรักษา คือเพื่อยืดอายุ ควบคุมอาการของโรค

และเพิ่มอัตราการรอดชีวิต หรือปรับปรุงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมให้ดีขึ้น Harbeck et al. (2019) จากสถิติผู้ป่วยมะเร็งเต้านมประเภท Invasive breast cancer ที่เข้ามารักษาที่โรงพยาบาลจุฬารัตน์ ในปี 2563 พบว่ามีจำนวน 389 ราย และจำนวนผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่ส่งตรวจ HER2 ด้วยเทคนิค FISH ในห้องปฏิบัติการโครโมโซม โรงพยาบาลจุฬารัตน์ ระหว่างปี 2561 ถึง 2563 จำนวน 186 ราย โดยเฉลี่ยประมาณ 62 ราย/ปี

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) เป็น Oncoprotein ที่อยู่ที่แขนข้างยาว (q) ของโครโมโซมคู่ที่ 17 (ตำแหน่ง 17q12) ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับ Tyrosine kinase โดย HER2 เป็นส่วนหนึ่งของ Epidermal Growth Factor Receptor family (EGFR) ซึ่งประกอบไปด้วย HER1 HER2 HER3 และ HER4 ที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต (Controls cell growth) การพัฒนาและการอยู่รอดของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่าง ๆ (Survival differentiation) การเคลื่อนที่ (Migration) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) Schlam and Swain (2021) โดย HER2 เป็นโปรตีนที่ไม่ต้องอาศัยลิแกนด์ในการทำงาน อีกทั้ง HER2 ยังมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยมะเร็งเต้านมที่เกิดจาก HER2 คิดเป็นร้อยละ 15 ถึง 20 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด นอกจากนี้ HER2 ยังเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สามารถบ่งบอกการพยากรณ์โรคที่สำคัญได้ ซึ่งการเกิด Amplification ของยีน HER2 มีความสัมพันธ์ที่เพิ่มความเสี่ยงและพัฒนาไปเป็นมะเร็งระยะลุกลามและแพร่กระจาย (Systemic metastasis) ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย Exman and Tolaney (2021) นอกจากนี้ HER2 amplification ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการให้เคมีบำบัดด้วย Anthracycline based ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ส่วนใหญ่ที่มีสถานะ HER2 Positive จะมีการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาแบบมุ่งเป้า (Targeted therapy) Ahn et al. (2020) โดยขั้นตอนการประเมินสถานะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทางห้องปฏิบัติการมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การตรวจ Immunohistochemistry (IHC) เป็นการตรวจปริมาณโปรตีนที่แสดงออกมาเกินไป หรือ การตรวจ *in situ* hybridization (ISH) ได้แก่ Chromogenic *in situ* hybridization (CISH), Silver-enhanced *in situ*

hybridization (SISH) หรือ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ซึ่งเป็นการตรวจการเพิ่มจำนวนของยีน HER2 ที่มีความจำเพาะเจาะจง เป็นต้น โดยในห้องปฏิบัติการ ในหลายๆ สถาบันมีการใช้เทคนิคเหล่านี้ร่วมกันในการตรวจวิเคราะห์สถานะ HER2 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม

ปัจจุบัน FISH เป็นหนึ่งในเทคนิคที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์สถานะ HER2 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม เนื่องจากเป็นการทดสอบที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA) ซึ่งการทดสอบ HER2 โดยปกติแล้วจะทดสอบด้วย IHC เป็นการทดสอบเบื้องต้น และตามด้วยเทคนิค FISH สำหรับตัวอย่างที่มีผลไม่ชัดเจน เช่น มีผล 2+ ของการตรวจ IHC หรือมีผลไม่สอดคล้องกัน (Equivocal or discordant results) Wolff et al. (2007) โดยการกำหนดสถานะ HER2 เป็นหนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการรักษาและการให้ยาทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมอย่างมีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโดยสามารถลดต้นทุนที่ไม่จำเป็นรวมถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น Xu et al. (2019) โดย The American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) Wolff et al. (2007) ได้กำหนดหลักเกณฑ์สำหรับการประเมินสถานะ HER2 ด้วยเทคนิค ISH โดยมีหลักเกณฑ์แรกออกมาในปี 2007 ได้กำหนดให้สถานะ HER2 เป็น positive เมื่ออัตราส่วนของ HER2/CEP17 มีค่ามากกว่า 2.2 หรือมีค่าเฉลี่ย HER2 gene copy มากกว่า 6.0 เพื่อปรับปรุงความถูกต้องและแม่นยำของการกำหนดสถานะ HER2

ในปี 2013 ASCO/CAP ได้มีการปรับปรุงแนวทางการกำหนดสถานะ HER2 รายละเอียดตามตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามการกำหนดสถานะ HER2 ตามหลักเกณฑ์ ASCO/CAP ปี 2013 พบว่า ในหลายการศึกษา ผลของสัดส่วนมะเร็งเต้านมเป็น HER2 positive และสัดส่วนของกรณีที่มีผล HER2 เป็นแบบก้ำกึ่ง มีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของรายที่มีผลแบบก้ำกึ่ง ถือเป็นความท้าทายในการรักษาทางคลินิก Fan et al. (2016); Long et al. (2015); Muller et al. (2015); Varga and Noske (2015) เพื่อเป็นการลดและแก้ไขปัญหากลุ่มนี้ ในปี 2018 ASCO/CAP ได้มีการปรับปรุงหลักเกณฑ์การกำหนดสถานะ HER2 อีกครั้ง โดยจัดกลุ่มเป็น 5 กลุ่ม และอ้างอิงผลของ IHC ในการ

กำหนดสถานะของ *HER2* ดังตารางที่ 1 Wolff et al. (2018); Zhang et al. (2020) และในปี 2023 ASCO/CAP ได้มีบทวนแนวทางการการจำกลุ่มสถานะ *HER2* อีกครั้ง

พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมและยืนยันให้ใช้การจำกลุ่มสถานะ *HER2* ตาม หลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2018 ตามเดิม Wolff et al. (2023)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงหลักเกณฑ์การกำหนดสถานะ *HER2* ของ ASCO/CAP ปี 2013 และ ปี 2018 ด้วยเทคนิค FISH (adopted by Wolff et al., 2018)

HER2 ISH Status	2013 ASCO/CAP guidelines	2018 ASCO/CAP guidelines
ISH positive	HER2/CEP17 ratio ≥ 2.0 HER2/CEP17 ratio < 2.0 and average HER2 copy number ≥ 6.0	HER2/CEP17 ratio ≥ 2.0 and average HER2 copy number ≥ 4.0 (group 1) HER2/CEP17 ratio ≥ 2.00 and average HER2 copy number < 4.0 (group 2) with concurrent IHC 3+ HER2/CEP17 ratio < 2.0 and average HER2 copy number ≥ 6.0 (group 3) with concurrent IHC 2+ or 3+ HER2/CEP17 ratio < 2.0 and average HER2 copy number ≥ 4.0 and < 6.0 (group 4) with concurrent IHC 3+
ISH equivocal	HER2/CEP17 ratio < 2.0 with average HER2 copy number ≥ 4.0 and < 6.0	No equivocal category
ISH negative	HER2/CEP17 ratio < 2.0 with average HER2 copy number < 4.0	HER2/CEP17 ratio < 2.0 and average HER2 copy number < 4.0 (group 5) HER2/CEP17 ratio ≥ 2.00 and average HER2 copy number < 4.0 (group 2) with concurrent IHC 2+ HER2/CEP17 ratio < 2.0 and average HER2 copy number ≥ 4.0 and < 6.0 (group 4) with concurrent IHC 2+ Group 2,3 and 4 with concurrent IHC 0 or 1+

ดังนั้น เพื่อยืนยันความถูกต้องของการกำหนดสถานะของ *HER2* ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมตามการแปลผลตาม ASCO/CAP guideline 2018 ว่าสอดคล้องกับ ASCO/CAP Guideline 2013 หรือไม่ทางห้องปฏิบัติการจึงเลือกประเด็นนี้มาศึกษา เพื่อปรับเปลี่ยน Guideline ให้เป็นปัจจุบัน และเลือกประเด็นจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผล *HER2* เพื่อกำหนดสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH ซึ่งยังเป็นประเด็นที่ถกเถียง มาเป็นวัตถุประสงค์ที่ใช้ในการศึกษานี้ โดยจำนวนเซลล์ที่เลือกมาศึกษา อ้างอิงมาจากการศึกษาก่อนหน้าของ Polónia et al. (2017) ที่มีการทดสอบจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ ผล *HER2* ด้วยเทคนิค silver in-situ hybridization ในมะเร็งเต้านมแบบ invasive ผลจากการศึกษาแนะนำว่าจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการการวิเคราะห์ผลอย่างน้อยคือ 40 เซลล์ แต่แนะนำการวิเคราะห์ผลที่ 60 เซลล์มากกว่า และ

Polónia and Caramelo (2021) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของ invasive cancer cell ด้วยเทคนิค FISH ในมะเร็งเต้านม โดยเทียบจำนวนเซลล์ 20 เซลล์ ต่อ 1 พื้นที่ จำนวน 5 พื้นที่ ซึ่งนับเป็น 100 เซลล์ และสรุปได้ว่าจำนวนเซลล์ขั้นต่ำที่แนะนำใน 2018 guideline ควรเพิ่มขึ้นเป็นอย่างน้อย 60 เซลล์ จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะ *HER2* ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้เกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018
2. เพื่อเปรียบเทียบการกำหนดสถานะของ *HER2* ด้วยจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน ระหว่าง 60 เซลล์และ 200 เซลล์โดยใช้เกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2018

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจาก คณะกรรมการจริยธรรม การวิจัยในคน ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ รหัสโครงการวิจัย EC 001/2566

1. กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างชิ้นเนื้อเต้านม (Breast tissue biopsy) จากผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเพศหญิง ของ โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ ที่ส่งตรวจ Fluorescence in situ hybridization (FISH) โดยคำนวณขนาดตัวอย่าง ตามสูตรดังนี้

$$\text{จากสูตร } n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 pq}{d^2}$$

เมื่อ n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง
 $Z_{\alpha/2}$ = 2.576 โดยที่ $\alpha = 0.01$
 p = ค่าสัดส่วนความสอดคล้องกัน
 ของวิธีการอ่าน 200 เซลล์กับ
 60 เซลล์ ในปี 2013 = 0.933
 q = 1-p = 0.067
 d = ค่าคลาดเคลื่อนสัมบูรณ์ของ
 ค่าสัดส่วน เท่ากับ 10 %

$$n = \frac{2.576^2 \times 0.933 \times 0.067}{(0.933 \times 0.1)^2}$$

$$= 47.65 \approx 48$$

ผู้วิจัยเก็บรวบรวมข้อมูล กรณีข้อมูลสูญหาย เพิ่มอีกร้อยละ 20 ดังนั้น ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ควรมีจำนวนอย่างน้อย 58 ราย

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง (Retrospective Study) ผู้วิจัยจึงดำเนินการเก็บข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่มีอยู่ ซึ่งมีจำนวนรวมทั้งสิ้น 75 ราย โดยไม่มีการสุ่ม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนและครอบคลุมมากที่สุด และเพื่อเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิจัยให้มากยิ่งขึ้น

2. เกณฑ์การคัดเลือก

เกณฑ์การคัดเข้า (Inclusion Criteria) คือ ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากเต้านม (Breast tissue biopsy) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ประเภท Invasive breast

cancer ที่ส่งตรวจ HER2 ด้วยเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ในโรงพยาบาลจุฬาภรณ์

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) คือ ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากเต้านม (Breast tissue biopsy) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ประเภท Carcinoma In situ และชิ้นเนื้อเต้านมที่อยู่ในระยะลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองและแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ

ซึ่งในงานวิจัยนี้มี 2 วัดคุณสมบัติโดยใช้ตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งมีตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์ทั้งสิ้นจำนวน 75 ตัวอย่าง

3. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

ทำการตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Section paraffin) ลงสไลด์เคลือบประจุบวก ขนาด 2 μ M, บ่มด้วย Hot air oven ที่อุณหภูมิ 56 °C ซั้วโม่ง Deparaffined ด้วย Xylene และเตรียมชิ้นเนื้อโดยใช้ Pretreatment solution (PathVysion Kit) ใช้ autopipette ตูต DNA probe (PathVysion HER-2 DNA Probe kit) จำนวน 10 μ l โดยหยดลงบนสไลด์ที่มีตัวอย่างชิ้นเนื้อแล้วปิดทับด้วย cover slip จากนั้นใช้ fixogum ปิดโดยรอบ Co-denature สไลด์ และ DNA probe ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 5 นาที และ hybridize ในเครื่อง Thermobrite ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง ล้าง DNA probe ส่วนเกินออก ด้วย Washing solution แล้วนำสไลด์ไปตากให้แห้ง ใช้ autopipette ตูตน้ำยา DAPI ที่ผสมกับ antifading solution แล้ว จำนวน 7 μ l หยดลงบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วย cover slip นำสไลด์ที่ได้ไปสแกนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) โดยใช้โปรแกรม MetaSystem software (version 3.11.6) โดยเลือกเซลล์บริเวณเดียวกับสไลด์ที่ย้อม HER2 ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC) ดำเนินการวิเคราะห์ผลโดยผู้วิเคราะห์ผล จำนวน 3 คน ได้แก่ นักวิจัย 1 คน และนักวิทยาศาสตร์ 2 คน โดยทำการนับจำนวน signal ที่ติดในเซลล์ Invasive breast cancer รูปแบบการวิเคราะห์ผลจะแบ่งเป็น กลุ่มที่ 1 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 200 เซลล์ โดยผู้วิเคราะห์ผล 3 คน แบ่งจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผล ได้แก่ นักวิทยาศาสตร์ 2 คน วิเคราะห์คนละ 75 เซลล์ นักวิจัย 1 คน วิเคราะห์ 50 เซลล์ และกลุ่มที่ 2 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด 60 เซลล์ โดยผู้วิเคราะห์ผล 3 คน แบ่งจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผลคนละ 20 เซลล์

ผลการวิเคราะห์ดำเนินการโดยผู้วิเคราะห์ 3 คน ได้แก่ นักวิทยาศาสตร์ 2 คน นักวิจัย 1 คน ซึ่งมีประสบการณ์ในการวิเคราะห์ผล เป็นเวลา 10, 4 และ 12 ปี ตามลำดับ โดยแต่ละคนวิเคราะห์ผลโดยไม่ทราบผลของผู้อื่น (blinded analysis) เนื่องจากมีระบบรหัสผ่านเข้าสู่ข้อมูลเฉพาะบุคคล

ในกรณีที่ผู้วิเคราะห์แต่ละผลอ่านผลแตกต่างกัน จะยึดผลวิเคราะห์ผลที่ตรงกัน 2 ใน 3 เพื่อให้ได้ข้อสรุปผลของตัวอย่างนั้น แต่ถ้าในกรณีที่ผู้วิเคราะห์แต่ละผลอ่านผลแตกต่างกันทั้ง 3 คน จะให้ผู้วิเคราะห์คนที่ 4

มาวิเคราะห์ผลเพิ่มเติมอีก 20 เซลล์ และยึดผลวิเคราะห์ผลที่ตรงกัน 2 ใน 4 เพื่อให้ได้ข้อสรุปผลของตัวอย่างนั้น และในการศึกษานี้ไม่มีตัวอย่างที่ผู้วิเคราะห์อ่านผลไม่ตรงกัน

จากนั้นทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ผลของการนับจำนวนเซลล์ 200 เซลล์ และการนับจำนวนเซลล์ 60 เซลล์ ต่อการกำหนดสถานะของ *HER2* ตาม ASCO/CAP ปี 2013 (ตารางที่ 1) และ ปี 2018 ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์ในการแบ่งแต่ละกลุ่มตามเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2018 (adopted by Wolff et al., 2018)

Group	ASCO/CAP Guideline 2018	HER2 IHC result	HER2 ISH result
Group 1	HER2/CEP17 ratio $\geq$ 2.0 Avg. HER2 copy number $\geq$ 4.0	0, 1+, 2+, 3+	Positive
Group 2	HER2/CEP17 ratio $\geq$ 2.0 Avg. HER2 copy number $<$ 4.0	3+	Positive
		0, 1+, 2+	Negative*
Group 3	HER2/CEP17 ratio $<$ 2.0 Avg. HER2 copy number $\geq$ 6.0	2+, 3+	Positive
		0, 1+	Negative*
Group 4	HER2/CEP17 ratio $<$ 2.0 Avg. HER2 copy number $\geq$ 4.0 and $<$ 6.0	3+	Positive
		0, 1+, 2+	Negative*
Group 5	HER2/CEP17 ratio $<$ 2.0 Avg. HER2 copy number $<$ 4.0	0, 1+, 2+, 3+	Negative

Ratio = ratio of *HER2* signals per cell over CEP17 signals per cell, Avg. = Average

*With comment

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติ

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสอดคล้อง (Concordance) การกำหนดสถานะ *HER2* ของ

ASCO/CAP ปี 2013 และ ปี 2018 และการกำหนดสถานะ *HER2* ระหว่างจำนวนเซลล์ 200 เซลล์และ 60 เซลล์ โดยทดสอบ Cohen's kappa coefficient ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้ทดสอบความสอดคล้อง (Consistency) ของข้อมูล 2 กลุ่มตามตารางที่ 3 และ ไคสแควร์ (Chi-square) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป STATA

ตารางที่ 3 ระดับความสอดคล้องของสถิติแคปปาตามแนวทางของ McHugh (2012)

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้อง	ร้อยละความเชื่อมั่น
0.00-0.20	ไม่มีความสอดคล้อง (None)	0-4
0.21-0.39	ความสอดคล้องน้อยมาก (Minimal)	4-15
0.40-0.59	ความสอดคล้องน้อย (Weak)	15-35
0.60-0.79	ความสอดคล้องปานกลาง (Moderate)	35-63
0.80-0.90	ความสอดคล้องมาก (Strong)	64-81
Above 0.90	ความสอดคล้องมากที่สุด (Almost Perfect)	82-100

ผลการวิจัย

1. การประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะยีน HER2 ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้เกณฑ์ของ SCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มโดย ASCO/CAP Guideline 2013 และ ASCO/CAP Guideline 2018 เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์ จำนวน 75 ราย มาวิเคราะห์ผลและจัดกลุ่มโดย ASCO/CAP

Guideline 2013 มาจัดกลุ่มใหม่ตามแนวทาง ASCO/CAP Guideline 2018 พบว่า มีจำนวนถึง 71 ราย (94.67%) ที่ผลไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อคำนวณสถิติ Cohen's kappa coefficient เพื่อดูความสอดคล้องของเกณฑ์ทั้งสอง พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ kappa มีค่าเท่ากับ 0.8886 แสดงว่าการแปลผลโดยใช้ ASCO/CAP Guideline 2013 และ ASCO/CAP Guideline 2018 มีความสอดคล้องกันมาก (Strong) ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความสอดคล้องในการอ่านผล 200 เซลล์ โดยใช้ ASCO/CAP Guideline 2013 เทียบกับ ASCO/CAP Guideline 2018

		200 cells ASCO/CAP Guideline 2013			Kappa	P-value
		Negative	Equivocal	Positive		
200 cells ASCO/CAP Guideline 2018	Negative	25	2	2	0.8886	<0.001
	Equivocal	0	0	0		
	Positive	0	0	46		

นอกจากนี้ยังพบว่ามีจำนวน 4 ราย (5.33%) ที่มีการเปลี่ยนกลุ่มจากการจัดกลุ่มตาม ผลการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์การจัดกลุ่มตามแนวทาง ASCO/CAP Guideline ปี 2013 โดยสามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผลกำกวม (Equivocal) จำนวน 2 ราย ที่เปลี่ยนเป็นผลลบ (Negative) และกลุ่มที่ผลบวก (Positive) เปลี่ยนเป็นผลลบ (Negative) จำนวน 2 ราย (2.67%)

2. เปรียบเทียบการกำหนดสถานะ HER2 ระหว่างจำนวน 200 เซลล์และ 60 เซลล์ โดยใช้ Guideline ASCO/CAP 2018

เมื่อพบว่าการใช้ ASCO/CAP Guideline 2018 ไม่ได้ทำให้สถานะ HER 2 ของผู้ป่วยเปลี่ยนแปลงไปมาก แต่ช่วยในการจัดกลุ่มผู้ป่วยที่เคยได้รับการ

กำหนดสถานะ HER2 แบบกำกวม ให้สามารถกำหนดสถานะเป็น Positive หรือ Negative ได้ คณะผู้วิจัยจึงศึกษาเปรียบเทียบการกำหนดสถานะ HER2 ร่วมกับผล IHC ระหว่างจำนวน 200 เซลล์และ 60 เซลล์ โดยจัดกลุ่มตาม ASCO/CAP Guideline 2018 เพื่อศึกษาว่าความแตกต่างของจำนวนเซลล์มีผลต่อการกำหนดสถานะ HER2 ในการวิเคราะห์ผลหรือไม่

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างการนับจำนวนเซลล์ 200 เซลล์และ 60 เซลล์ โดยใช้ แนวทาง ASCO/CAP ปี 2018 พบว่า มีจำนวนมีผู้ป่วยจำนวน 5 ราย จากทั้งหมด 75 ราย (6.67%) ที่มีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มการแปลผลจากเดิมตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนรายที่เปลี่ยนแปลงสถานะ *HER2* จากการอ่านผล 200 เซลล์ และ 60 โดยใช้ ASCO/CAP Guideline ปี 2018

Case	HER2 IHC result	200 cells		60 cells	
		ratio / Avg. HER2 copy number : HER2 ISH result	group	ratio / Avg. HER2 copy number: HER2 ISH result	group
1	1+	2.8/3.8 : Negative	2	3.8/4.5 : Positive	1
2	0	1.5/4.2 : Negative	4	2.1/4.9 : Positive	1
3	2+	1.8/3.9 : Negative	5	2.5/4.3 : Positive	1
4	2+	1.9/5.1 : Negative	4	2.3/5.3 : Positive	1
5	3+	2.2/4.6 : Positive	1	1.6/3.1 : Negative	5

Ratio = ratio of *HER2* signals per cell over CEP17signals per cell, Avg. = Average

ผลการศึกษการจัดกลุ่มการกำหนดสถานะ *HER2* เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผล ระหว่างการวิเคราะห์ผล 200 เซลล์ และการวิเคราะห์ผล 60 เซลล์ พบว่าผลจากการคำนวณสถิติ Cohen's kappa coefficient เพื่อดูความสอดคล้องในการอ่านผล 200 เซลล์ และ 60 เซลล์ โดยใช้ ASCO/CAP Guideline 2018 พบว่าสัมประสิทธิ์ Kappa มีค่าเท่ากับ 0.8567 ตาม

ตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า การอ่านผล 200 เซลล์ และ 60 เซลล์ โดยใช้ ASCO/CAP 2018 เป็น Guideline มีความสอดคล้องมาก (strong) แสดงให้เห็นว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน กล่าวคือไม่ว่าจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผลจะลดลงจาก 200 เซลล์ เหลือ 60 เซลล์ การกำหนดสถานะ *HER2* ไม่มีความแตกต่างกัน ผลยังคงไม่เปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความสอดคล้องในการอ่านผล 200 เซลล์ และ 60 เซลล์ โดยใช้ ASCO/CAP Guideline 2018

		60 cells ASCO/CAP Guideline 2018		Kappa	P-value
		Negative	Positive		
200 cells ASCO/CAP Guideline 2018	Negative	25	4	0.8567	<0.001
	Positive	1	45		

การอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มใหม่ตามแนวทาง ASCO/CAP Guideline 2018 โดยส่วนใหญ่ไม่ได้ทำให้สถานะ *HER2* ของผู้ป่วยเปลี่ยนแปลงไป และพบว่ามีความสอดคล้องกับแนวทางของ ASCO/CAP ของปี 2013 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zare et al. (2019) และ Farshid et al. (2022) ที่พบว่า การจัดกลุ่มสถานะ *HER2* โดยใช้แนวทาง ASCO/CAP ปี 2018 ให้ผลสอดคล้องกับ ASCO/CAP ปี 2013 คิดเป็น 89.3% และ 99% ตามลำดับ อีกทั้งช่วยในการจัดกลุ่มสถานะ *HER2* ของผู้ป่วยที่มีผลกำกวมให้สามารถจัดกลุ่มสถานะเป็น Negative หรือ Positive ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา ของ Liu et al. (2019)

และ Wang and Xu. (2019) ที่แสดงว่า การแปลผล FISH ที่มีผลเป็น แบบกำกวม ของมะเร็งเต้านมในระยะ Invasive ที่ผล Immunohistochemistry เป็น 2+ ตาม ASCO/CAP Guideline 2013 เมื่อจัดกลุ่มใหม่ตาม ASCO/CAP Guideline 2018 รายที่ เดิมถูกกำหนดสถานะ *HER2* เป็นแบบกำกวม ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มการรักษา สามารถจัดกลุ่มเป็น Positive หรือ Negative ได้ ทำให้สามารถช่วยตัดสินใจในการรักษา และการพยากรณ์โรคได้ ทำได้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการใช้แนวทางใหม่ตามหลักเกณฑ์ ASCO/CAP Guideline ปี 2018 ในการกำหนดสถานะ *HER2* ส่งผลต่อผลลัพธ์ของผู้ป่วยในการเปลี่ยนการดูแลรักษา

โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ไม่มีการระบุจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลที่แน่นอน อย่างเช่นการศึกษาของ Prendeville et al. (2016) มีการระบุใช้อย่างน้อย 20 เซลล์ หรือนับที่ 60 เซลล์โดยใช้ 3 tumor fields หรือการศึกษาของ Polónia et al. (2017) ในการศึกษาสถานะ *HER2* โดยใช้เทคนิค bright-field ISH ที่แนะนำให้นับอย่างน้อย 20 เซลล์ โดยนับเซลล์ที่ไม่ซ้อนทับกัน ใน 2 พื้นที่ที่แยกกันของ invasive cancer และสรุปว่าโดยส่วนใหญ่จะนับที่ 40 cells โดยนับอย่างน้อย 20 เซลล์ต่อ 1 พื้นที่

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการกำหนดสถานะของ *HER2* ด้วยจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน ระหว่าง 60 เซลล์และ 200 เซลล์ โดยใช้เกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2018 พบว่า การจัดกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้การกำหนดสถานะ *HER2* เปลี่ยนแปลง โดยพบว่าการเปลี่ยนสถานะ *HER2* ทั้งหมดจำนวน 5 ราย โดยมีจำนวน 4 ราย ที่เปลี่ยนสถานะ *HER2* จากการวิเคราะห์ผลจำนวน 200 เซลล์ ให้ผลเป็น Negative และเมื่อวิเคราะห์ผลจำนวน 60 เซลล์ ให้ผลเป็น Positive นอกจากนี้พบว่า มีจำนวน 1 รายที่มีผลการวิเคราะห์จำนวน 200 เซลล์ ที่ให้ผล Positive เมื่อวิเคราะห์ 60 เซลล์ พบว่าให้ผลเป็น Negative เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงในการวิเคราะห์ผล อาจเกิดการเคลื่อนออกจากบริเวณวิเคราะห์ที่มีการติดสัญญาณที่ชัดเจน ส่งผลให้การกำหนดสถานะ *HER2* เปลี่ยนแปลงไป Prendeville et al. (2016) โดย Rakha et al. (2015) แนะนำให้วิเคราะห์ผล จำนวน 20 ถึง 60 เซลล์ โดยเลือกบริเวณที่แตกต่างกัน 3 บริเวณ และแนะนำให้วิเคราะห์ผลจำนวนเซลล์ 60 ถึง 120 เซลล์ ในกรณีที่มีผลอัตราส่วน *HER2*/CEP17 อยู่ระหว่าง 1.80 ถึง 2.20 หรือเป็น heterogeneity Rakha et al. (2015) อย่างไรก็ตาม การอ่านผลจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น อาจจะไม่เกิดประโยชน์ต่อการกำหนดสถานะ *HER2* และอาจเป็นผลเสียได้ เนื่องจากผู้วิเคราะห์ผลอาจจะวิเคราะห์ผลเกินจากขอบเขตที่กำหนด ซึ่งถือเป็นข้อควรระวังในการวิเคราะห์ผล เช่น การนับจำนวนเซลล์ในส่วนที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง อาจทำให้เกิดการนับปะปนเซลล์ปกติ หรือนับเซลล์ในบริเวณที่ติดสัญญาณไม่ดี มี background มากเกินไป อาจทำให้วิเคราะห์ผลผิดพลาด ทำให้ผลเกิดความคลาดเคลื่อนได้ Prendeville et al. (2016) and Polónia et al. (2017)

สรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้รับ

การศึกษานี้ให้ความรู้ที่มีคุณค่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวินิจฉัยและการรักษามะเร็งเต้านม การศึกษานี้มีส่วนช่วยในหลาย ๆ ด้าน โดยจากการประเมินความสอดคล้องของการกำหนดสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH ด้วยหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ของปี 2013 และ ปี 2018 พบว่ามีความสอดคล้องกัน การจัดกลุ่มใหม่ตามแนวทาง ASCO/CAP Guideline 2018 ไม่ได้ทำให้สถานะ *HER2* ของผู้ป่วยเปลี่ยนแปลงไป แต่ยังช่วยในการจัดกลุ่มสถานะ *HER2* ของผู้ป่วยที่มีผลกำกวม ช่วยให้พยาธิแพทย์และผู้เชี่ยวชาญด้านมะเร็งวิทยาสามารถตัดสินใจเลือกการรักษาที่ชัดเจนยิ่งขึ้น ทำให้มั่นใจได้ว่าจะเลือกใช้การบำบัดด้วยยาต้าน *HER2* ได้อย่างเหมาะสม และความน่าเชื่อถือของการจำแนกประเภทของหลักเกณฑ์ ASCO/CAP 2018 ซึ่งยังคงไม่เปลี่ยนแปลงในปี 2023 สนับสนุนการนำหลักเกณฑ์นี้ไปใช้อย่างต่อเนื่องในการปฏิบัติทางคลินิก และเมื่อศึกษาการจัดกลุ่มการกำหนดสถานะ *HER2* โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ระหว่างการวิเคราะห์ผล 200 เซลล์ และการวิเคราะห์ผล 60 เซลล์ พบว่าไม่มีความแตกต่างในการกำหนดสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH เมื่อจำนวนเซลล์ในการวิเคราะห์ผลลดลง แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์เซลล์ 60 เซลล์แทนที่จะเป็น 200 เซลล์ให้ผลลัพธ์ที่คล้ายคลึงกัน สามารถทำให้การทดสอบ *HER2* มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดเวลาในการวิเคราะห์ผลและการใช้ทรัพยากร โดยไม่กระทบต่อความถูกต้อง

ดังนั้น งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าห้องปฏิบัติการสามารถนำหลักเกณฑ์ของ ASCO/CAP ปี 2018 มาปรับใช้เพื่อเป็นแนวทางการปฏิบัติในการประเมินสถานะ *HER2* โดยเทคนิค FISH เพื่อให้การรายงานผลเป็นปัจจุบัน ผู้ป่วยได้รับประโยชน์จากการรักษาเนื่องจากลดจำนวนผู้ป่วยที่มีผลกำกวม อีกทั้งลดการทดสอบเพิ่มเติมที่ไม่จำเป็นและความล่าช้าในการรักษาให้น้อยลง รวมถึงลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการรักษาได้

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

การศึกษานี้มีขนาดตัวอย่างจำนวน 75 ตัวอย่าง ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอที่จะสะท้อนผลในภาพรวมได้อย่างครอบคลุม ดังนั้น การศึกษาในอนาคตควรเพิ่มขนาดตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์

ทางสถิติและเพิ่มความสามารถในการอ้างอิงผลการศึกษาไปยังประชากรในวงกว้าง ตลอดจนสนับสนุนการนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติได้อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาระบบการรายงานผลของห้องปฏิบัติการ โดยปรับการประเมินสถานะ HER2 ให้สอดคล้องกับเกณฑ์ ASCO/CAP 2018 ซึ่งจะช่วยเพิ่มความถูกต้องของการรายงานผลและสนับสนุนการวางแผนรักษาที่เหมาะสม อันจะนำไปสู่การได้รับประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วย นอกจากนี้ ควรมีการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีฐานข้อมูลเพียงพอสำหรับการศึกษาวิจัยและการต่อยอดองค์ความรู้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Ahn, S., Woo, J. W., Lee, K., & Park, S. Y. (2020). HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 54(1), 34–44.
<https://doi.org/10.4132/jptm.2019.11.03>
- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 66, 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263.
<https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Crespo, J., Sun, H., Wu, J., Ding, Q. Q., Tang, G., Robinson, M. K., Chen, H., Sahin, A. A., & Lim, B. (2020). Rate of reclassification of HER2-equivocal breast cancer cases to HER2-negative per the 2018 ASCO/CAP guidelines and response of HER2-equivocal cases to anti-HER2 therapy. *PloS one*, 15(11), e0241775.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241775>
- Exman, P., & Tolaney, S. M. (2021). HER2-positive metastatic breast cancer: a comprehensive review. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*, 19(1), 40–50.
- Fan, Y. S., Casas, C. E., Peng, J., Watkins, M., Fan, L., Chapman, J., Ikpatt, O. F., Gomez, C., Zhao, W., & Reis, I. M. (2016). HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline. *Breast Cancer Research and Treatment*, 155(3), 457–462.
<https://doi.org/10.1007/s10549-016-3717-z>
- Farshid, G., Dhattrak, D., Gilhotra, A., Koszyca, B., & Nolan, J. (2020). The impact of 2018 ASCO-CAP HER2 testing guidelines on breast cancer HER2 results. An audit of 2132 consecutive cases evaluated by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 33(9), 1783–1790.
<https://doi.org/10.1038/s41379-020-0555-7>
- Gordian-Arroyo, A. M., Zynger, D. L., & Tozbikian, G. H. (2019). Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 guideline focused update. *American Journal of Clinical Pathology*, 152(1), 17–26.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/azq012>

- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Grant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 66.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Liu, Y., Wu, S., Shi, X., Luo, Y., Pang, J., Wang, C., Mao, F., Liang, Z., & Zeng, X. (2019). HER2 double-equivocal breast cancer in Chinese patients: a high concordance of HER2 status between different blocks from the same tumor. *Breast Cancer Research and Treatment*, 178(2), 275–281.
<https://doi.org/10.1007/s10549-019-05387-6>
- Long, T. H., Lawce, H., Durum, C., Moore, S. R., Olson, S. B., Gatter, K., & Troxell, M. L. (2015). The new equivocal: Changes to HER2 FISH results when applying the 2013 ASCO/CAP guidelines. *American Journal of Clinical Pathology*, 144(2), 253–262.
<https://doi.org/10.1309/AJCP3Q9WFOQTKUW>
- McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, 22(3), 276–282.
- Muller, K. E., Marotti, J. D., Memoli, V. A., Wells, W. A., & Tafe, L. J. (2015). Impact of the 2013 ASCO/CAP HER2 guideline updates at an Academic Medical Center that performs primary HER2 FISH testing: Increase in equivocal results and utility of reflex immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*, 144(2), 247–252.
<https://doi.org/10.1309/AJCP5NCHWPSMR5D>
- Polónia, A., Eloy, C., Pinto, J., Braga, A. C., Oliveira, G., & Schmitt, F. (2017). Counting invasive breast cancer cells in the HER2 silver in-situ hybridization test: how many cells are enough?. *Histopathology*, 71(2), 247–257.
<https://doi.org/10.1111/his.13208>
- Polónia, A., & Caramelo, A. (2021). HER2 in situ hybridization test in breast cancer: Quantifying margins of error and genetic heterogeneity. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 34(8), 1478–1486.
<https://doi.org/10.1038/s41379-021-00813-x>
- Prendeville, S., Corrigan, M. A., Livingstone, V., Feeley, L., Bennett, M. W., Browne, T. J., & O'Connell, F. (2016). Optimal scoring of brightfield dual-color In situ hybridization for evaluation of HER2 amplification in breast carcinoma: How many cells are enough?. *American Journal of Clinical Pathology*, 145(3), 316–322.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw017>
- Rakha, E. A., Pinder, S. E., Bartlett, J. M., Ibrahim, M., Starczynski, J., Carder, P. J., Provenzano, E., Hanby, A., Hales, S., Lee, A. H., Ellis, I. O., & National Coordinating Committee for Breast Pathology (2015). Updated UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 68(2), 93–99.
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202571>
- Schlam, I., & Swain, S. M. (2021). HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*, 7(1), 56.
<https://doi.org/10.1038/s41523-021-00265-1>
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., & Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of Medicine*, 344(11), 783–792.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>

- Varga, Z., & Noske, A. (2015). Impact of modified 2013 ASCO/CAP guidelines on HER2 testing in breast cancer. One year experience. *PloS One*, 10(10), e0140652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140652>
- Wang, J., & Xu, B. (2019). Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 4, 34. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>
- Wheeler, F. C., Kim, A. S., Mosse, C. A., Shaver, A. C., Yenamandra, A., & Seegmiller, A. C. (2018). Limited Utility of Fluorescence In Situ Hybridization for Recurrent Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis and Follow-up. *American journal of clinical pathology*, 149(5), 418–424. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy002>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., ... Hayes, . F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(1), 118–145. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2775>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., & Hayes, D. F. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 31(31), 3997–4013. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.50.9984>
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M., & Dowsett, M. (2018). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(20), 2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>
- Wolff, A. C., Somerfield, M. R., Dowsett, M., Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., McShane, L. M., Saphner, T. J., Spears, P. A., & Allison, K. H. (2023). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO-College of American Pathologists guideline update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(22), 3867–387. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02864>
- Wynn, C. S., & Tang, S. C. (2022). Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions. *Cancer Metastasis Reviews*, 41(1), 193–209. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10021-x>
- Xu, Z., Guo, D., Jiang, Z., Tong, R., Jiang, P., Bai, L., Chen, L., Zhu, Y., Guo, C., Shi, J., & Yu, D. (2019). Novel HER2-targeting antibody-drug conjugates of trastuzumab beyond

- T-DM1 in breast cancer: Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a) and (Vic-)Trastuzumab Duocarmazine (SYD985). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111682.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111682>
- Zare, S., Rong, J., Daehne, S., Roma, A., Hasteh, F., Dell'Aquila, M., & Fadare, O. (2019). Implementation of the 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines on HER2/neu assessment by FISH in breast cancers: Predicted impact in a single institutional cohort. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 32(11), 1566–1573.
<https://doi.org/10.1038/s41379-019-0295-8>
- Zhang, H., Moisini, I., Ajabnoor, R. M., Turner, B. M., & Hicks, D. G. (2020). Applying the new guidelines of HER2 testing in breast cancer. *Current Oncology Reports*, 22(5), 51.
<https://doi.org/10.1007/s11912-020-0901-4>