# تفسیر نتایج ایمنوهیستوشیمی بیان HER2/neu در سرطان مهاجم پستان: بررسی توافق بین مشاهده‌کنندگان و در دو بار مشاهده توسط یک نفر


*دکتر مریم کدیور[I]

دکتر پریسا عسکرزاده[II]

دکتر نسرین شایانفر[III]

دکتر علیرضا صادقی‌پور[IV]

دکتر مریم بهرامی‌نژاد[V]



## چکیده

**هدف و زمینه:** تعیین صحیح وضعیت HER2/neu در سرطان مهاجم پستان، به‌خصوص در زمینه نتایج درمان با Herceptin یک نکته مهم است. هدف از این مطالعه، بررسی توافق بین مشاهده کنندگان و در دوبار مشاهده توسط یک نفردر تفسیر نتایج ایمنوهیستوشیمی HER2/neu در سرطان مهاجم پستان می‌باشد.

**روش بررسی:** نوع مطالعه بررسی مقطعی بود و از روش نمونه‌گیری آسان استفاده شد. رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی HER2/neu برای ۱۰۷ مورد سرطان پستان شناخته شده، انجام شد. بیان بیش از حد پروتئین توسط ٤ پاتولوژیست به‌طور مستقل با استفاده از معیارهای DAKO درجه‌بندی شد (۰ تا+۳ براساس شدت و الگوی رنگ‌پذیری در ۱۰٪ یا بیشتر از سلول‌های توموری). بعد از یک جلسه مشترک برای یکسان‌سازی نظرات، نمونه‌ها برای بار دوم بررسی شدند. فاصله بین دو بررسی حداقل دو ماه بود. اسلایدهایی که در مورد درجه رنگ‌پذیریشان نظرات یکسان نبود، با استفاده از یک میکروسکوپ ٥ چشمی توسط هر ٤ نفر مورد بازبینی قرار گرفتند تا در مورد آن‌ها توافق نظر حاصل شده و درجه واحدی به هر یک داده شود. توافق بین مشاهده‌کنندگان و توافق در دو بار مشاهده توسط یک نفر با استفاده از آماره کاپا محاسبه شد.

**یافته‌ها:** توافق کامل در ۳۳ (۳۱٪) و ٤۰ (۳۷٪) مورد از ۱۰۷ مورد به ترتیب در بار اول و دوم بررسی به‌دست آمد. توافق کلی بین مشاهده‌کنندگان متوسط بود (کاپا برای بار اول ۰/٤٤ و برای بار دوم ۰/۵۱)، به این ترتیب که توافق برای گروه های وسطی (+۱ و+۲) نسبتاً خوب وبرای گروه‌های کناری (۰ و+۳) متوسط بود. توافق برای دوبار مشاهده توسط یک نفر نیز متوسط بود (کاپا ۰/۵۵ تا ۰/٦۰). با در نظر گرفتن سه گروه به صورت منفی (۰ و +۱)، مثبت ضعیف (+۲) و مثبت قوی (+۳)، توافق کلی بین مشاهده‌کنندگان بهبود یافت، ولی همچنان در سطح متوسط باقی ماند (کاپا۰/٥٤ و ۰/٦۰ به ترتیب برای بار اول ودوم) و گروه +۲ حداقل توافق را نشان داد. با گروه‌بندی موارد به عنوان منفی (۰ و+۱) و مثبت (+۲و+۳)، توافق کلی بین مشاهده‌کنندگان به حد قابل قبول رسید (کاپا ۰/٦۸ و ۰/۷۵ به ترتیب برای بار اول و دوم). همچنین با این فرض، توافق برای دوبار مشاهده توسط یک نفر نیز به حد قابل قبول رسید (کاپا۰/۷۱ تا ۰/۸٤). طبق توافق نظر به‌دست آمده درجه رنگ‌پذیری در ٤۲ مورد (۳۹/۲٪) صفر، در ۱۹ مورد (۱۷/۸٪) +۱، در ۲۷ مورد (۲۵/۲٪) +۲، و در ۱۱ مورد (۱۰/۳٪) +۳ بود. در ۸ مورد (۷/۵٪)، هیچ توافقی به‌دست نیامد که در ٦ مورد مشکل بین +۲ و +۳ و در ۲ مورد بین +۱ و ۰ بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که تکرارپذیری (که همان توافق بین مشاهده‌کنندگان می‌باشد) برای بررسی وضعیت HER2 در سرطان مهاجم پستان با استفاده از IHC و به کار بردن معیارهای DAKO در حد متوسط است. ولی برای افتراق بین حالت مثبت و منفی تکرارپذیری بهتر (در حد قابل قبول) است.



**کلیدواژه‌ها:** ۱- HER2/neu ۲- توافق بین مشاهده‌کنندگان ۳- سرطان مهاجم پستان


## مقدمه

گیرنده عامل رشد اپیدرمی انسانی-۲ (HER2/neu)، عضوی از خانواده گیرنده عامل رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor receptor-EGFR) است که در ۲۰- ۱۸٪ موارد سرطان پستان بیان بیش از حد دارد و باعث درجه تهاجم بالای تومور و پیش‌آگهی بد می‌شود.[1] بیان بیش از حد این پروتئین در اثر تقویت ژنی رخ می‌دهد و علاوه بر پیشرفت تومور می‌تواند باعث مقاومت به انواع مختلفی از درمان‌های سیستمیک (مثل


این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه دکتر پریسا عسگرزاده جهت دریافت درجه دکترای تخصصی پاتولوژی به راهنمایی دکتر مریم کدیور، سال ۱۳۸۷.



I) دانشیار و متخصص پاتولوژی، بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص)، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)

II) دستیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

III) استادیار و متخصص پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

IV) دانشیار و متخصص پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

V) متخصص پاتولوژی





[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

سیکلوفسفامید/ متوتروکسات و تاموکسیفن) باشد. از طرف دیگر درمان با یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین HER2 (مثل هرسپتین، تراستوزوماب) می‌تواند در بیمارانی که تومورشان بیان بیش از حد HER2 نشان می‌دهد، افزایش بقا ایجاد کند[۱-۵] بنابراین ارزیابی دقیق وضعیت HER2 در سرطان پستان اهمیت زیادی دارد.

ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemical-IHC) شایع‌ترین روش برای این ارزیابی است؛ چون ارزان و آسان است و زمان کمتری نسبت به دیگر روش‌ها نیاز دارد. ولی چون پروتکل‌ها، روش‌های بررسی و سیستم‌های درجه‌بندی مختلفی برای IHC استفاده می‌شود و به‌خصوص چون ارزیابی شدت رنگ‌پذیری سابژکتیو و کیفی می‌باشد، موضوع تغییرپذیری در تفسیر نتایج آن مطرح می‌گردد.[۲] از طرف دیگر تصمیم‌گیری درمانی سرطان پستان تحت تأثیر این تفسیرها می‌باشد. بنابراین عدم تغییرپذیری آن‌ها (تکرارپذیری، سطح توافق) یک نکته مهم و کلیدی است. تکرارپذیر بودن یک آزمایش باعث ارزش و اعتبار آن می‌شود و ثبات آن آزمایش برای طبقه‌بندی یک اختلال را تأمین می‌کند[۱].

تا به حال اکثر مطالعات در زمینه تکرارپذیری تفسیر نتایج IHC برای HER2 در سرطان پستان، توافق بین آزمایشگاه‌ها را بررسی کرده‌اند. در مورد توافق بین مشاهده‌کنندگان، مطالعاتی وجود دارد.[۶-۱۳] ولی تا جایی که ما اطلاع داریم در ایران مطالعه‌ای در این مورد انجام نشده است. بنابراین تصمیم گرفته شد تا در این زمینه پژوهشی انجام گیرد. هدف از انجام این پژوهش بررسی تکرارپذیری تفسیر نتایج ایمونوهیستوشیمی HER2 در سرطان مهاجم پستان بین مشاهده‌کنندگان و نیز در دوبار مشاهده توسط یک نفر می‌باشد.

## روش بررسی

این مطالعه مقطعی بود و از روش نمونه‌گیری آسان استفاده شد. بلوک‌های پارافینی فیکس شده در فرمالین از ۱۰۷ مورد متوالی سرطان مهاجم پستان که بافت کافی برای بررسی داشتند، انتخاب شدند. از هر بلوک پارافینی برش‌هایی با ضخامت ۴-۳ میکرومتر تهیه و روی اسلایدهای پوشیده شده با پلی‌ال لیزین قرار داده شدند. سپس در گزیلن دپارافینه شده و پس از آن توسط کاهش درجه اتانول آب‌دهی شدند. بلوک فعالیت پراکسیداز اندوژن با قراردهی ۲۰ دقیقه‌ای در $H_2O_2$ ۳٪ (در الکل مطلق) انجام شد. سپس مرحله بازیابی اپیتوپ به وسیله غوطه‌وری اسلایدها در بافر سیترات ۱۰mmol/L (pH=۶) در اتوکلاو برای ۲۰ دقیقه صورت گرفت که پس از آن، سرد کردن تا دمای اتاق، ظرف ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس اسلایدها با آنتی‌بادی خرگوشی پلی‌کلونال ضد HER2 انسانی DAKO با شماره A0485 (رقت $\frac{۱}{۲۰۰}$) برای یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. رنگ‌آمیزی ایمنوپروکسیداز با استفاده از کیت LSAB پروکسیداز DAKO انجام و با استفاده از محلول کروموژن (۱۰- ۵ دقیقه) قابل مشاهده شد. سپس اسلایدها با هماتوکسلین رنگ شدند.

چهار پاتولوژیست به طور مستقل اسلایدها را با توجه به معیارهای DAKO بررسی کردند. همه موارد از ۰ تا +۳ درجه‌بندی شدند. وقتی رنگ‌پذیری غشایی برای HER2 وجود نداشت یا در کمتر از ۱۰٪ سلول‌های توموری به صورت کامل یا ناکامل و قوی یا ضعیف دیده می شد، درجه رنگ‌پذیری ۰ بود. رنگ‌پذیری ناکامل غشایی در >۱۰٪ سلول‌های تومور درجه یک، رنگ‌پذیری کامل غشایی اما ضعیف تا متوسط در >۱۰٪ سلول‌های توموری درجه ۲ و رنگ‌پذیری کامل غشایی اما قوی در >۱۰٪ سلول‌های توموری درجه ۳ بود. سپس جلسه مشترکی بین ۴ پاتولوژیست به منظور آموزش برای ارزیابی بهتر و یکسان سازی معیارهایشان برگزار شد.

بعد از گذشت حداقل ۲ ماه ازبررسی اول، اسلایدها مجدداً مورد ارزیابی ۴ پاتولوژیست قرار گرفتند. اسلایدهایی که در مورد درجه رنگ‌پذیریشان نظرات یکسان نبود، با استفاده از یک میکروسکوپ ۵ چشمی توسط هر ۴ نفر مورد بازبینی قرار گرفتند تا در مورد آن‌ها توافق نظر حاصل شده



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

و درجه واحدی به هر یک داده شود.

توافق بین مشاهده‌کنندگان (interobserver) و بین دو بار مشاهده توسط یک نفر (intraobserver) با استفاده از آماره کاپا توسط نرم‌افزار stata محاسبه شد. کاپا توافق را با کنار گذاشتن شانس اندازه می‌گیرد و تفسیر آن طبق نظری است که توسط Landis و Koch ارائه شده است.[۱۴] به این ترتیب که اگر مقدار آن ۱/۰۰-۰/۸۱ باشد، قدرت توافق تقریباً کامل است. وقتی ۰/۸۰-۰/۶۱ باشد، نشانه قدرت توافق قابل قبول است. وقتی ۰/۶۰-۰/۴۱، ۰/۴۰-۰/۲۱ و ۰/۲۰- صفر باشد، قدرت توافق به ترتیب متوسط، نسبتاً خوب و ناچیز است.

## یافته‌ها

**مشخصات بیماران و تومورها**: مشخصات بیماران و تومورها در جدول شماره ۱ آمده است. توزیع نوع تومورها به این شرح بود: ۶۳ داکتال NOS، ۹ لوبولار، ۲ موسینوس، ۲ مدولاری، ۲ کریبریفورم، ۱ پاپیلاری، ۱ توبولار و ۱ آپوکرین. طبق توافق نظر به‌دست آمده درجه رنگ‌پذیری در ۴۲ مورد (۳۹/۲٪) صفر، در ۱۹ مورد (۱۷/۸٪) +۱، در ۲۷ مورد (۲۵/۲٪) +۲، و در ۱۱ مورد (۱۵/۳٪) +۳ بود. در ۸ مورد (۷/۵٪) هیچ توافقی به دست نیامد، که در ۶ مورد مشکل بین +۲ و +۳ و در ۲ مورد بین +۱ و صفر بود.

**توافق بین مشاهده‌کنندگان**: توافق کامل بین ۴ پاتولوژیست به ترتیب در ۳۳ مورد (۳۱٪) و ۴۰ مورد (۳۷٪) از ۱۰۷ مورد در بار اول و دوم بررسی به‌دست آمد. کاپای کلی توافق متوسط را نشان داد. کاپای کلی برای گروه‌های وسطی (+۲ و +۱) در هر دو بار توافق نسبتاً خوب برای گروه‌های کناری (+۳ و ۰) در بار اول توافق متوسط و در بار دوم، توافق قابل قبول را نشان داد (جدول شماره ۲). کاپای جفتی برای توافق بین مشاهده‌کنندگان در بار اول در حد نسبتاً خوب و در بار دوم متوسط بود. کاپای جفتی برای توافق بین مشاهده‌کنندگان با نظر اجماعی بار اول درحد متوسط و بار دوم در حد قابل قبول بود (جدول شماره ۳).

**جدول شماره ۱**- مشخصات بیماران و تومورها

| | |
|---|---|
| **سن (سال)** | |
| میانه | ۴۶ (محدوده ۹۰-۲۵) |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۵ |
| **اندازه تومور (سانتی‌متر)** | |
| میانگین | ۳ (محدوده ۱۰-۰/۵) |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۳۵ |
| **نوع بافتی** | |
| داکتال | ۶۶ |
| لوبولار | ۹ |
| دیگر موارد | ۹ |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۲۳ |
| **گرید بافتی** | |
| ۱ | ۱۳ |
| ۲ | ۲۵ |
| ۳ | ۲۹ |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۴۰ |
| **گرید هسته** | |
| ۱ | ۷ |
| ۲ | ۴۳ |
| ۳ | ۱۸ |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۳۹ |
| **گره‌های لنفاوی اگزیلاری** | |
| درگیر | ۳۶ |
| غیردرگیر | ۲۲ |
| اطلاعات در دسترس نبود | ۴۹ (۱۴ مورد لامپکتومی) |

**جدول شماره۲**. مقدار کاپای کلی

| | بار اول | بار دوم |
|---|---|---|
| **لایه بندی موارد در ۴ گروه** | | |
| ۰ | ۰/۵۴ | ۰/۶۴ |
| +۱ | ۰/۳۴ | ۰/۴۱ |
| +۲ | ۰/۳۳ | ۰/۳۹ |
| +۳ | ۰/۵۷ | ۰/۶۲ |
| کلی | ۰/۴۴ | ۰/۵۱ |
| **لایه بندی موارد در ۳ گروه** | | |
| منفی | ۰/۶۸ | ۰/۷۵ |
| مثبت ضعیف | ۰/۳۳ | ۰/۳۸ |
| مثبت قوی | ۰/۵۶ | ۰/۶۲ |
| کلی | ۰/۵۴ | ۰/۶۰ |
| **لایه‌بندی موارد در۲گروه (منفی و مثبت)** | ۰/۶۸ | ۰/۷۵ |



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

**جدول شماره۳**- مقدار کاپای جفتی

| پاتولوژیست/ بررسی | ۲ | ۳ | ۴ | نظراجماعی |
|---|---|---|---|---|
| **بار اول** | | | | |
| ۱ | ۰/۳۷ | ۰/۴۳ | ۰/۵۰ | ۰/۴۵ |
| ۲ | | ۰/۴۲ | ۰/۴۸ | ۰/۴۱ |
| ۳ | | | ۰/۴۴ | ۰/۵۷ |
| ٤ | | | | ۰/۴٤ |
| **بار دوم** | | | | |
| ۱ | ۰/۴۹ | ۰/۵۳ | ۰/۵٤ | ۰/۷۷ |
| ۲ | | ۰/۴۸ | ۰/٦۰ | ۰/۵۰ |
| ۳ | | | ۰/۴٦ | ۰/٦٤ |
| ٤ | | | | ۰/٦۰ |

در بار دوم، توافق کامل در ٤۰ مورد به دست آمد که توزیع آن به این ترتیب بود: ۱۹ مورد صفر، ۹ مورد +۱، ۵ مورد +۲، و ۷ مورد +۳ . در ٤۲ موردی که طبق نظر اجماعی درجه صفر داشتند در ۱۹ مورد هر ٤ پاتولوژیست، در ۸ مورد ۳ پاتولوژیست، در ۸ مورد ۲ پاتولوژیست، و در ٦ مورد فقط ۱ پاتولوژیست درجه صفر داده بودند. به زبان دیگر به طور کلی ۱٦۸ بار درجه‌بندی مربوط به این٤۲ مورد وجود داشت که ۱۲۲ بار آن درجه صفر بود (٤۳ بار آن درجه +۱ و ۳ بار آن درجه +۲ گرفته بودند). در ۱۹ موردی که طبق نظر اجماعی درجه +۱ داشتند، در۹ مورد هر ٤ پاتولوژیست، در ۸ مورد ۳ پاتولوژیست و در ۲ مورد ۲ پاتولوژیست درجه +۱ داده بودند. در ۲۷ موردی که طبق نظر اجماعی درجه +۲ داشتند، در۵ مورد هر ٤ پاتولوژیست، در ۷ مورد ۳ پاتولوژیست و در ۸ مورد ۲ پاتولوژیست درجه +۲ داده بودند. در بقیه موارد، ۲۱ بار درجه +۳ و ۲۲ بار درجه +۱ و۱ بار درجه صفر منظور شده بود. در ۱۱ مواردی که طبق نظر اجماعی درجه +۳ داشتند در ۷ مورد هر ٤ پاتولوژیست، در ۲ مورد ۳ پاتولوژیست و در ۱ مورد ۲ پاتولوژیست درجه +۳ داده بودند. در ٤ موردی که توافق کامل وجود نداشت ۷ بار توسط ۳ پاتولوژیست درجه +۲ گرفته بودند (جدول شماره ٤).

**جدول شماره۴**- توزیع نظر اجماعی و کل درجات در بررسی دوم

| | نظر اجماعی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ۰ | +۱ | +۲ | +۳ |
| تعداد موارد | ٤۲ | ۱۹ | ۲۷ | ۱۱ |
| **تعداد پاتولوژیستهایی که همان درجه را دادند** | | | | |
| ٤پاتولوژیست | ۱۹ | ۹ | ۵ | ۷ |
| ۳پاتولوژیست | ۸ | ۸ | ۷ | ۲ |
| ۲پاتولوژیست | ۸ | ۲ | ۸ | ۱ |
| ۱پاتولوژیست | ٦ | ۰ | ۷ | ۱ |
| ۰پاتولوژیست | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ |
| **توزیع ۴۲۸ بار درجه بندی** | | | | |
| ۰ | ۱۲۲ | ۵ | ۱ | ۰ |
| +۱ | ٤۳ | ٦٤ | ۲۲ | ۰ |
| +۲ | ۳ | ٦ | ٦٤ | ۷ |
| +۳ | ۰ | ۱ | ۲۱ | ۳۷ |
| جمع | ۱٦۸ | ۷٦ | ۱۰۸ | ٤٤ |

افتراق منفی (+۱ و ۰) از مثبت (+۳ و +۲) توافق در ۹۷ از ۱۰۷ مورد نشان داده شد. افتراق مثبت ضعیف (+۲) از مثبت قوی (+۳) فقط در ۱۱ مورد از ۳۸ مورد مثبت همخوانی نشان دادند (کاپای کلی= ۰/۳۵). کاپای جفتی برای توافق بین مشاهده‌کنندگان برای مثبت ضعیف و مثبت قوی کم تا متوسط بود (جدول شماره ۵).

**جدول شماره ۵**- مقدار کاپای جفتی برای افتراق مثبت ضعیف از مثبت قوی در بررسی دوم

| پاتولوژیست | ۲ | ۳ | ۴ | نظراجماعی |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰/٤٦ | ۰/۳۳ | ۰/٤۵ | ۰/٤۰ |
| ۲ | | ۰/۳۲ | ۰/٤٤ | ۰/۲۷ |
| ۳ | | | ۰/۱۵ | ۰/٤۵ |
| ٤ | | | | ۰/٤۹ |

**توافق در دوبار مشاهده توسط یک نفر**: توافق در دوبار مشاهده برای پاتولوژیست ۱ و ۲ و ۳ و ٤ به ترتیب در ٦۷/۳٪، ٦۸/۲٪، ۷۱٪ و ٦۸/۲٪به دست آمد. کاپای جفتی برای هر پاتولوژیست حدتوافق متوسط را نشان داد. با لایه‌بندی موارد در دو گروه مثبت و منفی، توافق برای همه به حد قابل قبول افزایش



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

یافت (جدول شماره ٦).

**جدول شماره ۶**- توافق برای یکنفر در دو بار بررسی (کاپا)

| پاتولوژیست | لایه بندی موارد در ۴ گروه | لایه بندی موارد در ۲ گروه |
|---|---|---|
| ۱ | ۰/۵۵ | ۰/۷۳ |
| ۲ | ۰/۵۵ | ۰/۷۱ |
| ۳ | ۰/٦۰ | ۰/۸٤ |
| ٤ | ۰/۵۷ | ۰/۷٦ |

## بحث

در حال حاضر بررسی وضعیت HER2 یک جزء جدایی‌ناپذیر در اداره بیماران دارای سرطان پستان است. چون بیان بیش از حد این پروتئین که در ۲۰- ۱۸٪ موارد سرطان پستان وجود دارد، باعث پیش‌آگهی بد می‌شود.[۱] در ضمن در این موارد بیماران کاندید درمان با داروی تراستوزوماب (Trastuzumab)، یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پروتئین HER2/neu، می‌شوند. تکنیک‌های مختلفی برای بررسی وضعیت HER2 استفاده می‌شوند که شامل: IHC، هیبریدیزاسیون در جای فلورسانس (Flourescent in situ hybridization-FISH)، هیبریدیزاسیون در جای کروموژنیک (Chromogenic in situ hybridization-CISH) و هیبریدیزاسیون در جای سیلور (Silver in situ hybridization-SISH) می‌باشد.[۲ و ۱۷-۱۵]

IHC شایع‌ترین روش است. پس، استانداردسازی این تست برای بررسی صحیح وضعیت HER2 لازم است. بعد از آن پرسش مهم، تکرارپذیری این تست می‌باشد که در مطالعه حاضر این پارامتر با استفاده از آماره کاپا بررسی شد.

توافق بین مشاهده‌کنندگان در لایه‌بندی موارد در ٤ گروه با استفاده از معیارهای DAKO، در حد متوسط بود. کاپای کلی در هر دوبار برای گروه‌های وسطی (+۱ و +۲) نسبتاً خوب و برای گروه‌های کناری (+۳ و ۰) متوسط تا قابل قبول بود. توافق با در نظر گرفتن سه گروه به عنوان منفی (+۱ و صفر)، مثبت ضعیف (+۲) و مثبت قوی (+۳) بهبود یافت، ولی همچنان در سطح متوسط باقی ماند و با در نظر گرفتن دو گروه منفی (+۱ و صفر) و مثبت (+۳ و +۲) به حد قابل قبول رسید.

نتایج مطالعه حاضر در مورد توافق کلی با نتایج مطالعه Hitoshi Tsuda و همکارانش همخوانی دارد. آن‌ها نیز در بررسی ۱۰٦ مورد سرطان پستان توسط ۵- ٦ پاتولوژیست، به سطح توافق متوسط (کاپای ۰/٤٦) رسیدند؛ ولی در نتایج آن‌ها در مورد درجه +۳ توافق کامل بود، درحالیکه در مطالعه حاضر توافق در حد قابل قبول بود.[٦]

نتایج مطالعه حاضر مانند نتایج گروه Inqat است. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که تکرارپذیری بین مشاهده‌کنندگان رضایت‌بخش نیست، ولی تعیین دو گروه کناری (+۳ و صفر) آسان‌تر از دو گروه وسطی (+۲ و +۱) می‌باشد.[۷] این موضوع ثانوی در مطالعه انجام شده توسط Thomson TA و همکاران نیز بیان شده است. به این ترتیب که توافق بین مشاهده‌کنندگان برای درجه صفر و +۳ خوب و برای درجه +۱ و +۲ ناچیز بوده است. آن‌ها مانند مطالعه حاضر این نکته را هم گزارش کرده‌اند که با در نظر گرفتن درجه +۱ و صفر به عنوان گروه منفی، از اختلاف بین مشاهده‌کنندگان کم می‌شود.[۸] این کاهش اختلاف با گروه‌بندی موارد به عنوان منفی و مثبت در مطالعه Chih-Yi-Hsu و همکاران نیز ذکر شده است.[۹] در یک مطالعه مولتی سنتریک توسط Lacroix-Triki و همکاران کاپای کلی خوب بود، ولی گروه +۲ سطح توافق ناچیز نشان داده بود که این موضوع مانند مطالعه حاضر می‌باشد.[۱۰] در چند مطالعه دیگری که برای بررسی تکرارپذیری تفسیر نتایج IHC برای HER2 انجام شده است، نیز سطح توافق قابل قبول تا کامل بوده است.[۱۳-۱۱]

همان‌طور که ذکر شد مقادیر کاپای مختلفی برای توافق بین مشاهده‌کنندگان در مطالعات قبلی گزارش شده است که اکثراً بهتر از مقادیر به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد. دلیل این موضوع می‌تواند اختلاف در جمعیت مورد مطالعه، نوع آنتی‌بادی به کار



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

رفته، نوع سیستم درجه‌بندی مورد استفاده و نکات تکنیکی باشد. در مورد جمعیت مورد مطالعه یک فاکتور مهم، توزیع سطوح مختلف بیان HER2 در آن جمعیت می‌باشد. همان‌طور که چندین مطالعه نشان داده‌اند، کمترین توافق بین مشاهده‌کنندگان مربوط به گروه‌های وسطی بیان HER2 می‌باشد و درصد مواردی که در این قسمت قرار می‌گیرند، روی توافق کلی اثر می‌گذارد.[۱۰] در مطالعه حاضر با توجه به نظر اجماعی، حدود یک‌چهارم موارد در گروه +۲ قرار گرفتند، که بیش از موارد ذکر شده در گزارش‌های قبلی است. در هر حال، در مطالعه حاضر فراوانی واقعی بیان بیش از حد HER2 قابل بررسی نبود. چون FISH به عنوان یک روش مرجع برای مقایسه، یک تکنیک خاص و گران است و در دسترس نبود.

موضوع دیگر، معیارهای درجه‌بندی مورد استفاده توسط مؤلفین مختلف برای تفسیر سطح بیان HER2 می‌باشد. در مطالعه حاضر از سیستم DAKO (پُرکاربردترین سیستم) استفاده شد که برای افتراق درجه‌های +۲ و +۳، تعداد سلول‌های مثبت را در نظر نمی‌گیرد، بلکه تنها وجه افتراق را شدت رنگ‌پذیری قرار می‌دهد که بسیار سابژکتیو است و منجر به اختلاف نظر بین مشاهده‌کنندگان می‌شود. در عین حال، تمایز +۲ از +۳ خیلی مهم است، چون تنها بیمارانی تحت درمان تراستوزوماب قرار می‌گیرند که تومورشان در گروه +۳ باشد. بعضی مطالعات دیگر، جزئیات اضافه‌تری را در معیارهای درجه‌بندی لحاظ کرده و نشان داده‌اند که ترکیب کمیت و کیفیت سلول‌های مثبت باعث بهبود تکرارپذیری می‌شود.[۹و۱۰] بعضی سیستم‌ها نیز از آنالیز تصویری کامپیوتری کمک گرفته‌اند و به نتایج بهتری رسیده‌اند، ولی این سیستم‌ها در دسترس همه آزمایشگاه‌ها نیستند و برای کارهای روزانه عملی نیستند.[۱۸]

نکته مهم دیگر، مشکلات تکنیکی IHC است که یکی از عوامل کاهش تکرارپذیری در مطالعه حاضر می‌باشد. درواقع در مطالعه حاضر مقدار زیادی رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی سلول‌ها وجود داشت که منجر به پوشیده شدن رنگ‌پذیری غشایی واقعی می‌شد. این مشکل در این مطالعه احتمالاً مهم‌ترین عامل اختلاف در تفسیر نتایج می‌باشد. اگرچه افتراق موارد منفی (+۱ و ۰) از مثبت (+۲ و +۳) سطح توافقی قابل قبول داشت، ولی افتراق صفر از +۱ و +۲ از +۳ خوب نبود. همان‌طور که قبلا ذکر شد افتراق +۲ از +۳ خیلی مهم ولی در عین حال مستعد به سابژکتیوی زیادی است که در حضور رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی مشکلات بیشتری در این افتراق پیش می‌آید. در افتراق درجه صفر از +۱ نیز در مطالعه حاضر اختلاف نظر شایع بود، چون تنها معیاری که این دو را از هم جدا می‌کند تعداد سلول‌هایی است که رنگ‌پذیری غشایی دارند و تعیین حد ۱۰٪ برای آن در زمینه رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی مشکل بود؛ به خصوص وقتی که نواحی دارای رنگ‌پذیری غشایی کوچک و غیرمداوم بودند. ولی در هر صورت اختلاف بین صفر و +۱ اهمیت بالینی ندارد.

یکی از ملاحظات مهم در تکنیک IHC استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی است و عدم استفاده از اسلاید کنترلی برای هر مورد در مطالعه حاضر، یک عامل مشکل‌ساز دیگر بود. رنگ‌پذیری غیریکنواخت که در بعضی از موارد مطالعه حاضر وجود داشت، نیز منجر به سابژکتیوی و در نتیجه اختلاف نظر در تخمین کمیت ناحیه مثبت شد. موضوع دیگر این است که درجه‌بندی باید در نواحی معرف تومور باشد. نواحی که خوب حفظ نشده‌اند، مثل کناره‌ها و نواحی‌له شده و آرتفکت‌های حرارتی می‌توانند باعث اختلاف در تفسیرها شوند.

یک راهنمای توصیه شده برای تفسیر نتایج IHC برای HER2 این است که بررسی و درجه‌بندی در جزء



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

مهاجم و نه در جزء درجا انجام شوند. به‌نظر می‌رسد که عدم توجه به این مورد ممکن است یکی از عوامل مؤثر در اختلاف نتایج باشد.

فاکتورهای دیگر منجر به تغییرپذیری نتایج که در مطالعات دیگر به آن‌ها اشاره شده است عبارتند از رنگ‌پذیری ضعیف در بیش از ۳۰٪ سلول‌های توموری و رنگ‌پذیری غشایی ناکامل به طور وسیع.

توافق در دو بار توسط یک نفر نیز در چند مطالعه بررسی شده است.[۷،۱۱ و ۱۲] همه آن‌ها به سطوح قابل قبول توافق رسیده‌اند. در مطالعه Rodriguez و همکاران توافق تقریباً کامل بود (کاپا ۰/۸۷ و ۱)[۱۲] و در مطالعه Santinelli و همکاران سطح توافق قابل قبول تا کامل به دست آمد (کاپا ۰/٦ تا ۰/۸۹).[۱۱] ولی مطالعه حاضر توافق متوسط نشان داد. یک توضیح قابل دفاع این است که در مطالعه حاضر یک جلسه برای استاندارد کردن معیارهای درجه‌بندی بین دو بار مشاهده اسلایدها وجود داشت. این جلسه اگرچه که بار دوم باعث بهبود در توافق بین هر پاتولوژیست با نظر اجماعی شد، ولی از طرف دیگر باعث شد که توافق در دو بار مشاهده توسط هر پاتولوژیست کم شود و در حد متوسط و نه در حد قابل قبول باشد. علاوه بر آن، فاکتورهای مؤثر در اختلاف نتایج در مورد توافق کلی بین مشاهده‌کنندگان که در بالا ذکر شدند، در اینجا نیز تأثیر داشتند.

در این مطالعه از آنتی‌بادی خرگوشی پلی‌کلونال ضد HER2 انسانی DAKO با شماره A0485 استفاده شد. شاید با Herceptest نتایج بهتری به دست می‌آمد. Herceptest، اولین تست بالینی مورد تأئید FDA برای بررسی وضعیت HER2 است و معرف‌ها و روش‌های استاندارد دارد.[۹]

در پایان باید ذکر شود که در مطالعه حاضر طبق نظر اجماعی ۳۸٪ موارد مثبت بودند (+۳ و +۲) که بیش از نسبت مثبت در مطالعات دیگر می‌باشد. این نسبت بالا در یک مطالعه انجام شده دیگر در ایران نیز گزارش شده است.[۱۹] مطالعات دیگر با استفاده از FISH برای تأیید یا رد این موضوع مورد نیاز است.

محدودیت‌های این مطالعه عبارت بودند از: ۱. عدم دسترسی به FISH به عنوان یک روش مرجع برای مقایسه ۲. عدم کفایت رنگ‌پذیری در بعضی از اسلایدها و ۳. موجود نبودن اطلاعات کامل بعضی از بیماران.

## نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تکرارپذیری (که همان توافق بین مشاهده‌کنندگان می‌باشد) برای بررسی وضعیت HER2 در سرطان مهاجم پستان با استفاده از IHC و به‌کار بردن معیارهای DAKO در حد متوسط است. ولی برای افتراق بین حالت مثبت و منفی تکرارپذیری بهتر (در حد قابل قبول) است.

برای بهبود تکرارپذیری تفسیر نتایج ایمنوهیستوشیمی HER2/neu، پیشنهاداتی ارائه می‌گردد:

۱) مطالعات بیشتر و با تعداد موارد بیشتر در این زمینه

۲) استاندارد کردن پروتکل‌های IHC، کالیبراسیون IHC با FISH، استفاده از اسلایدهای کنترل و کنترل‌های خارجی دوره‌ای

۳) رعایت کامل راهنماها،

٤) برنامه‌های آموزشی مداوم،

٥) استاندارد کردن معیارهای قضاوت با استفاده از اسلاید- کنفرانس و اطلس‌های رنگی،

٦) ارزیابی نتایج IHC توسط دو نفر یا بیشتر به‌طور مستقل و بررسی بیشتر در موارد ناهمخوان،

۷) گروه‌های میانی و موارد متناقص یک تست تأییدی مثل FISH داشته باشد،

۸) انجام IHC برای HER2 در یک آزمایشگاه معتبر انجام شود و تفسیر آن توسط شخص آموزش دیده و خبره باشد.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

## فهرست منابع

1- Wolff A, Hammond E, Schwartz J, Hagerty K, Allred C, Cote R, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2007; 131(1): 18–43.

2- Nabholtz J, Tonkin K, Reese D. Breast cancer management. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. P. 245-257.

3- Mc Ilroy M, Fleming F, Buggy Y, Hill A,Young L. Tamoxifen-induced ER-α–SRC-3 interaction in HER2 positive human breast cancer; a possible mechanism for ER isoform specific recurrence. Endocr Relat Cancer 2006; 13 (4): 1135-1145.

4- Shou J, Massarweh S, Osborne K, Wakeling A, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu Cross-Talk in ER/HER2–Positive Breast Cancer. J Nati Cancer Inst 2004; 96(12): 926-935.

5- Gutierrez C, Detre S, Johnston S, Mohsin S, Shou J, Allred C, et al. Molecular Changes in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: Relationship Between Estrogen Receptor, HER-2, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. J Clin Oncol 2005; 23(11): 2469-2476.

6. Tsuda H, Sasano H, Akiyama F, Kurosumi M, Hasegawa T, Osamura RY, et al. Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by HercepTest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma. Pathol Int 2002; 52(2): 126-34.

7- Italian Network for Quality Assurance of Tumor Biomarkers (INQAT) Group. Interobserver reproducibility of immunohistochemical HER-2/neu assessment in human breast cancer: an update from INQAT round III. Int J Biol Markers 2005; 20(3): 189-94.

8- Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. Mod Pathol 2001; 14(11): 1079-86.

9- Hsu C, Ho D, Yang C, Lai C, Yu I, Chiang H.Interobserver reproducibility of Her-2/neu protein overexpression in invasive breast carcinoma using the DAKO HercepTest. Am J Clin Pathol 2002; 118(5): 693-8.

10- Lacroix-Triki M, Mathoulin-Pelissier S, Ghnassia JP, Macgrogan G, Vincent-Salomon A, Brouste V, et al. High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer: a multicentre GEFPICS study. Eur J Cancer 2006; 42(17): 2946-53.

11- Santinelli A, Baccarini M, Colanzi P, Stramazzotti D, Fabris G.Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in infiltrating breast carcinoma: a study of reproducibility. Anal Quant Cytol Histol 2002; 24(1): 54-62.

12- Rodriguez Moguel L, Vega Ramos B. Reproducibility of Her-2/neu overexpression with HERCEP test in invasive ductal breast cancer. Gynecol Obstet Mex 2002; 70: 601-6.

13- Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N.HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. Am J Clin Pathol 2000; 113(6): 852-9.

14- Landis Jr, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33: 159-174.

15- Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. Pathology 2006; 38(2): 120-4.

16- Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. Mod Pathol 2005; 18(8): 1015-21.

17- Dietel M, Ellis I, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. Virchows Arch 2007; 451(1): 19-25.

18- Lehr H, Jacobs T, Yaziji H. Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis. Am J Clin Pathol 2001; 115: 814-822.

19- Saatee S, Afrakhteh M, Sadrolhefazi B. High Prevalence of HER-2/neu Overexpression among Iranian Women with Breast Cancer: True or False? Breast J 2006; 12(5): 499-501.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]

# *Interpretation of Immunohistochemistry Results of HER2/neu Expression in Invasive Breast Cancer: Evaluation of Interobserver and Intraobserver Agreement*

***M. Kadivar, MD[I] P. Askarzadeh, MD[II] N. Shayanfar, MD[III] A.R. Sadeghipour, MD[IV] M. Bahraminejad, MD[V]**

## *Abstract*

**Background and Aim:** The accurate determination of HER-2 in invasive breast cancer has become a critical issue, particularly in context of the results of Herceptin adjuvant therapy. The aim of this study was to evaluate inter- and intraobserver reproducibility of assessment of HER2/neu immunostaining in invasive breast cancer

**Materials and Methods:** This study was cross sectional and the convenience sampling method was applied. IHC for HER2/neu was performed on 107 archival invasive breast carcinoma tissues. Protein overexpression was scored independently by 4 pathologists using the criteria recommended by DAKO (0 to 3+ reflecting the intensity and pattern of the immunohistochemical signal present in 10% or more of tumor cells.). After a session in order to train for better evaluation and standardization of the scoring criteria, the samples were evaluated for the second time. A minimum of two months elapsed between the two examinations. The discrepancies in scoring results were reviewed by the 4 observers using a multihead microscope to obtain consensus. The inter- and intraobserver agreements were calculated by kappa statistics.

**Results:** Complete agreement was achieved in 33 (31%) and 40 (37%) of 107 cases in the first and second examinations, respectively. Generally, interobserver agreement was moderate (Kappa=0.44 in the first examination and 0.51 in the second one), with intermediate categories (1+, 2+) showing fair agreement and extreme categories (0, 3+) showing moderate agreement. Intraobserver agreement was also moderate (from the minimum kappa=0.55 to the maximum of 0.60). Considering three groups as negative (0/1+), weakly positive (2+) and strongly positive (3+), interobserver agreement improved but still staying in the moderate level (kappa=0.54 and 0.60 in the first and second time, respectively) with score 2+ group showing the least level of agreement. However, with dividing the cases into two groups as negative (0/1+) and positive (2+/3+), interobserver agreement improved to substantial level (kappa=0.68 and 0.75 in the first and second time, respectively).Also, with this consideration, intraobserver agreement improved to substantial level (0.71 to 0.84). By consensus there were 42 cases (39.2%) that were scored 0, 19 cases (17.8%) scored 1+, 27 cases (25.2%) scored 2+, and 11 cases (10.3%) scored 3+. For 8 cases (7.5%) no consensus was achieved; in 6 of them the problem was placing them into 2+ or 3+ category and in 2 cases the problem was placing them into 0 or 1+ category.

**Conclusion:** Our study showed that reproducibility (interobserver agreement) is moderate for evaluation of HER2 status in invasive breast carcinoma by IHC using DAKO criteria. However, for discrimination between negative and positive state, reproducibility (that is in substantial level) is better.

**Key Words:1) HER2/neu 2) Interobserver agreement 3) Invasive breast cancer**

*This article is a summary of the thesis by P. Askharzadeh, MD for the degree of speciality in Pathology under supervision of M. Kadivar, MD (2008).*

***I)*** *Associate Professor of Pathology, Niayesh Str., Sattarkhan Ave, Hazrat-e-Rasool Akram, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*

***II)*** *Resident of Pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

***III)*** *Assistant Professor of Pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

***IV)*** *Associate Professor of Pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran*

***V)*** *Pathologist*



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-20 ]