

**RISQUES BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
QUALITE DES LABORATOIRES**

**COMMISSION D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
GROUPE DE TRAVAIL EEQ**

**EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE
DES ANALYSES D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

RAPPORT GLOBAL DEFINITIF

IMMUNOHISTOCHEMIE – HER2/ER

ENQUETE 2022/1

Sciensano/Immunohistochimie/14-FR

Risques biologiques pour la santé
Qualité des laboratoires
Rue J. Wytsman, 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

GROUPE DE TRAVAIL EEQ

Sciensano					
Secrétariat		TEL:	02/642.55.21	FAX:	02/642.56.45
Vanessa Ghislain	Coordinateur d'enquête	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	Vanessa.Ghislain@sciensano.be		
Membres groupe de travail EEQ	Institution				
Gabriela Beniuga	IPG Gosselies				
Cecile Colpaert	ZNK Turnhout				
Bart De Wiest	OLV Aalst				
Caroline Fervaille	CHU UCL Namur				
Bart Lelie	AZ-ZENO Knokke-Heist				

Une version provisoire (draft) de ce rapport a été transmise aux membres du groupe de travail EEQ le : 11/05/2022.

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du groupe de travail EEQ du : /.

Autorisation du rapport : par Vanessa Ghislain, coordinateur d'enquête

Date de publication : 19/05//2022

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:
https://www.wiv-isp.be/QML/Anapath/external_quality/rapports/_fr/rapports.htm

TABLE DE MATIERES

1. Introduction	4
1.1. Objectif de l'EEQ	4
1.2. Activités sous-traitées	4
1.3. Matériel de l'EEQ	4
1.4. Demande	4
1.5. Formulaire de réponse	5
2. Relecture	5
2.1. Critères généraux	5
2.2. Critères spécifiques par épitope	5
2.2.1. HER2	5
2.2.2. RO	6
2.3. Évaluation finale	6
2.3.1. HER2	6
2.3.2. RO	6
3. Résultats	7
3.1. Participation à l'EEQ	7
3.2. Aperçu des résultats	7
3.3. Résultats par anticorps	8
3.3.1. HER2	8
3.3.2. RO	8
3.4. Résultats de l'interprétation HER2	8
3.4.1. Score biopsie 1	8
3.4.2. Score biopsie 2	9
3.4.3. Score biopsie 3	9
3.4.4. Score biopsie 4	10
3.4.5. Score biopsie 5	10
3.4.6. Guidelines utilisées pour l'interprétation des résultats	11
4. Discussion des résultats	11
4.1. HER2	11
4.2. RO	11
4.3. Interprétation HER2	12
5. Images	14

1. Introduction

Ce document comprend un résumé ainsi qu'une discussion des résultats de l'évaluation externe de la qualité (EEQ) Immunohistochimie 2022/1 (HER2/ER) et un résumé des commentaires individuels et des recommandations.

1.1. OBJECTIF DE L'EEQ

Cette EEQ avait pour objectif d'évaluer la qualité des colorations immunohistochimiques HER2 et ER (RO, récepteur d'œstrogènes).

1.2. ACTIVITÉS SOUS-TRAITÉES

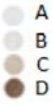
Le matériel tissulaire a été fourni par le laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital OLV d'Alost.

1.3. MATÉRIEL DE L'EEQ

Le matériel transmis comportait 2 coupes de paraffine non colorées avec 1) des biopsies au trépan provenant des pièces opératoires et 2) des lignées cellulaires (« FFPE »). Les biopsies comportaient des tissus normaux ainsi que des tumeurs cliniquement pertinentes. Les biopsies ont montré différents niveaux d'expression de protéines (forte, modérée, faible, aucune expression).

Les blocs multitissulaires ont été libérés par le groupe de travail EEQ le 09/02/2022. L'évaluation du bloc multitissulaire HER2 était basée sur des colorations IHC avec les anticorps de Ventana/Roche (clone 4B5) et Dako/Agilent (anticorps polyclonal) et sur une hybridation in situ (SISH). NordiQC a également coloré les coupes (Pathway de Roche et HercepTest d'Agilent).

Le sous-clone des cellules 3+ dans la biopsie 4 (voir 2.2.1) n'était pas présent dans les coupes utilisées pour la libération de l'enquête. **Néanmoins, ce sous-clone était présent dans toutes les coupes de tous les participants.**

	HER2		RO	
Biopsies		1) Carcinome mammaire 2) Carcinome mammaire 3) Carcinome mammaire 4) Carcinome mammaire 5) Carcinome mammaire		1) Col utérin 2) Amygdale 3) Carcinome mammaire 4) Carcinome mammaire 5) Carcinome mammaire 6) Carcinome mammaire
Lignées cellulaires		A) Carcinome mammaire B) Carcinome mammaire C) Carcinome gastrique D) Carcinome mammaire		A) Ostéosarcome B) Carcinome urothélial C) NSCLC D) Carcinome mammaire

L'homogénéité des échantillons a été testée par le laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital OLV d'Alost. L'homogénéité a été vérifiée par contrôle microscopique de la coloration immunohistochimique à plusieurs niveaux (effectuée toutes les 30 coupes). Les échantillons ont été considérés comme homogènes (au sens où chaque coupe renferme une information identique) et stables jusqu'à la fin de la période d'analyse.

1.4. DEMANDE

Il était demandé de réaliser les colorations HER2 et RO, selon les procédures habituelles du laboratoire. Le laboratoire pouvait ajouter sa propre coupe de contrôle (témoin externe) ; par contre, le témoin HER2 devait être envoyé. Il était précisé que le traitement des échantillons devait être le même que celui des échantillons des patients, c.-à-d. qu'ils devaient être intégrés dans le circuit habituel des échantillons des patients.

Il était également demandé d'enregistrer le score HER2 pour chacune des biopsies. Aucune interprétation n'était demandée pour RO.

1.5. FORMULAIRE DE RÉPONSE

Il a été demandé de remplir un formulaire de réponse concernant les méthodes utilisées. Ce formulaire a été établi par le coordinateur d'enquête et a été joint aux lames.

2. Relecture

L'évaluation des lames a été réalisée conjointement et simultanément par 2 pathologistes et par le coordinateur d'enquête, Vanessa Ghislain (Sciensano). Dans ce but, les évaluateurs se sont réunis à la date du 29 mars 2022 à Sciensano. Pour plus d'anonymat, les lames des laboratoires n'étaient pas identifiées par leur numéro de participant (QMLxxx), mais par un numéro aléatoire uniquement connu du coordinateur EEQ. Cette structure administrative et scientifique garantit la qualité et l'anonymat des résultats.

Pour le test HER2, les témoins ont également été évalués (voir ci-dessous). Les scores rapportés pour l'interprétation des biopsies HER2 ont été évalués mais n'ont pas été pris en compte dans le résultat final.

2.1. CRITÈRES GÉNÉRAUX

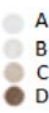
Globalement, l'évaluation est basée sur :

- **la spécificité** : un signal suffisant et spécifique doit être présent ;
- **le bruit de fond** : en principe, une coloration immunohistochimique ne doit pas générer de bruit de fond aspécifique ;
- **la morphologie** : la coloration doit modifier le moins possible la morphologie.

2.2. CRITÈRES SPÉCIFIQUES PAR ÉPITOPE

2.2.1. HER2

Biopsies et lignées cellulaires :

			IHC	ISH (ratio)
Biopsies*	1. Carcinome mammaire 2. Carcinome mammaire 3. Carcinome mammaire 4. Carcinome mammaire 5. Carcinome mammaire		1) 0 2) 1-2+ 3) 1-2+ 4) 2+ (3+ localement) 5) 3+	1) Not amplified (1.03) 2) Not amplified (1.30) 3) Not amplified (1.69) 4) Amplified (2.18) 5) Amplified (2.26)
Lignées cellulaires	A. Carcinome mammaire B. Carcinome mammaire C. Carcinome gastrique D. Carcinome mammaire		A) 0 B) 1+ C) 2+ D) 3+	A) Not amplified B) Not amplified C) Equivocal D) Amplified

(*) Colorations réalisées cf. le point 1.3 ; scoring selon les guidelines ASCO/CAP 2018.

Evaluation du tissu de contrôle du laboratoire :

Tissu de contrôle présent ?	Conforme aux directives* ?	Directives*
Oui / Non	Conforme / Pas conforme	The use of external controls with known HER2 levels alongside the assay procedure is mandatory. Positive (IHC score 3+) and negative (IHC score 0/1+) controls are a minimal requirement.

(*) Update of the Belgian guidelines for HER2 testing in breast cancer
Lambein K., Guiot Y., Galant C., Salgado R., Colpaert C.
Belg J Med Oncol 2014;8(4):109-15

2.2.2. RO

Biopsies :

- 1) **Col utérin** : coloration nucléaire modérée à forte de la majorité de l'épithélium cylindrique, de l'épithélium squameux basal et de la majorité des cellules stromales (à l'exception des cellules endothéliales et lymphoïdes)
- 2) **Amygdale** : au minimum une coloration nucléaire faible à modérée des cellules folliculaires dendritiques dispersées/cellules T et de l'épithélium squameux
- 3) **Carcinome mammaire** : coloration nucléaire forte de 100% des cellules tumorales
- 4) **Carcinome mammaire** : coloration nucléaire faible de 1-10% des cellules tumorales (expression faible)
- 5) **Carcinome mammaire** : coloration nucléaire modérée de 80-90% des cellules tumorales
- 6) **Carcinome mammaire** : aucune coloration nucléaire des cellules tumorales

Lignées cellulaires :

- A) **Ostéosarcome** : négatif
- B) **Carcinome urothélial** : faiblement positif
- C) **NSCLC** : positif
- D) **Carcinome mammaire** : fortement positif

2.3. ÉVALUATION FINALE

2.3.1. HER2

- **Optimal** : la coloration de la biopsie 4 correspond avec un score 2+ (3+ localement) ; la coloration de la biopsie 3 correspond avec un score 1+ ou 2+ ; absence de coloration cytoplasmique (ou présence d'une coloration cytoplasmique faible) interférant avec l'interprétation de la coloration membranaire
- **Bon** : coloration faussement positive (par ex. la coloration sur la biopsie 1 correspond avec un score 1+) ou en moyenne, coloration membranaire passable mais peu intense ou présence d'une coloration cytoplasmique interférant avec l'interprétation de la coloration membranaire ou contre-coloration insuffisante ou la coloration du sous-clone 3+ de la biopsie 4 est conforme au résultat attendu mais la coloration des autres cellules de la même biopsie ne correspond pas avec le résultat attendu 2+/amplifié (coloration trop faible)
- **Borderline** : une des lignées cellulaires est faussement négative ; une optimisation de la méthode est nécessaire
- **Insuffisant** : la coloration de la biopsie 5 correspond avec un score 0 ou 1+ ; une optimisation de la méthode est nécessaire et urgente

2.3.2. RO

- **Optimal** : la coloration correspond avec les critères décrits ci-dessus (voir 2.2.2.)
- **Bon** : en moyenne, coloration peu intense (p. ex. coloration trop faible du col utérin ou de l'amygdale) ou coloration insuffisante sur les lignées cellulaires ou coloration faussement positive sur les lignées cellulaires ou coloration cytoplasmique ou contre-coloration insuffisante ou coloration faiblement positive sur la biopsie 6 de sorte que le résultat puisse être interprété comme (faussement) positif
- **Borderline** : coloration faussement positive sur l'endothélium du col utérin ou coloration cytoplasmique interférant avec l'interprétation ou coloration insuffisante des biopsies 3 ou 5 (c.-à-d. $\geq 1\%$ et $< 10\%$ de positivité) ou aucune coloration du col utérin ou de l'amygdale ou de la biopsie 4 (expression faible) ; une optimisation de la méthode est nécessaire
- **Insuffisant** : coloration faussement négative ou faussement positive sur une biopsie mammaire (c.-à-d. $< 1\%$ de positivité sur les biopsies 3 et 5 ou $\geq 1\%$ de positivité sur la biopsie 6 ou $> 10\%$ de positivité sur la biopsie 4) ou surcoloration générale ; une optimisation de la méthode est nécessaire et urgente

3. Résultats

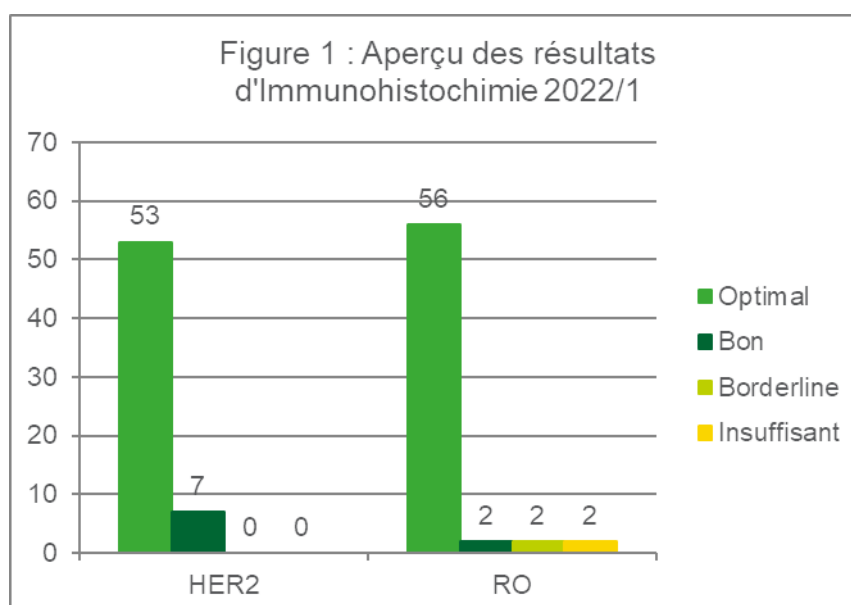
3.1. PARTICIPATION À L'EEQ

Le taux de participation a été de 62/64 (97%).

Région	Nombre de laboratoires ayant reçu des coupes (inscrits)	Nombre de laboratoires ayant renvoyé une coupe HER2	Nombre de laboratoires ayant renvoyé une coupe RO
Région Flamande	40	37	39
Région Bruxelloise	9	8	8
Région Wallonne	15	15	15
Sociétés pharm.	0	0	0
Total	64	60	62

3.2. APERÇU DES RÉSULTATS

Evaluation finale	HER2	RO
Optimal	53 (88%)	56 (90%)
Bon	7 (12%)	2 (3%)
Borderline	0	2 (3%)
Insuffisant	0	2 (3%)
Total	60	62



3.3. RÉSULTATS PAR ANTICORPS

3.3.1. HER2

HER2							
Clone	N	Fournisseur	Optimal	Bon	Border-line	Insuffisant	Acceptable*
Anticorps concentrés (n = 19)							
Polyclonal	18	Dako/Agilent Technologies	13	5	0	0	100%
ml SP3	1	Cell Marque/Ventana/Roche	1	0	0	0	1/1
Anticorps prêts à l'emploi (n = 41)							
ml 4B5	34	Cell Marque/Ventana/Roche	32	2	0	0	100%
ml DG44 (HercepTest)	6	Dako/Agilent Technologies	6	0	0	0	100%
ms CB11	1	Leica / Novocastra	1	0	0	0	1/1

(*) optimal/bon

ms = anticorps monoclonal de souris

ml = anticorps monoclonal de lapin

3.3.2. RO

RO							
Clone	N	Fournisseur	Optimal	Bon	Border-line	Insuffisant	Acceptable*
Anticorps concentrés (n = 3)							
ml SP1	2	Cell Marque/Ventana/Roche	0	0	1	1	0/2
ml EP1	1	Dako/Agilent Technologies	1	0	0	0	1/1
Anticorps prêts à l'emploi (n = 59)							
ml SP1	34	Cell Marque/Ventana/Roche	34	0	0	0	100%
ml EP1	22	Dako/Agilent Technologies	19	2	0	1	95%
ms SF11	2	Leica / Novocastra	1	0	1	0	1/2
Non rapporté	1	Cell Marque/Ventana/Roche	1	0	0	0	1/1

(*) optimal/bon

ms = anticorps monoclonal de souris

ml = anticorps monoclonal de lapin

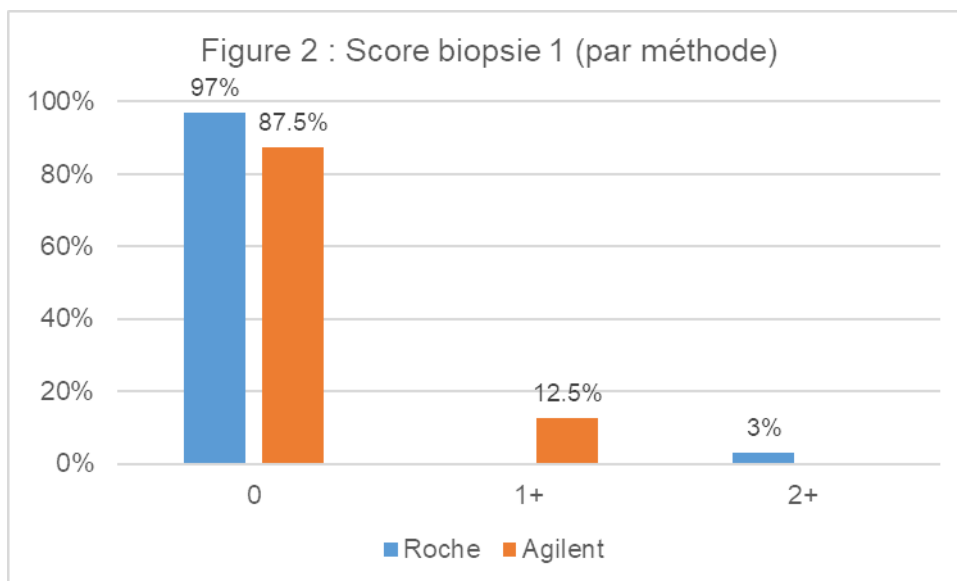
3.4. RÉSULTATS DE L'INTERPRÉTATION HER2

Un laboratoire n'a pas rapporté les scores.

3.4.1. Score biopsie 1

Le résultat attendu pour cette biopsie était un **score 0**.

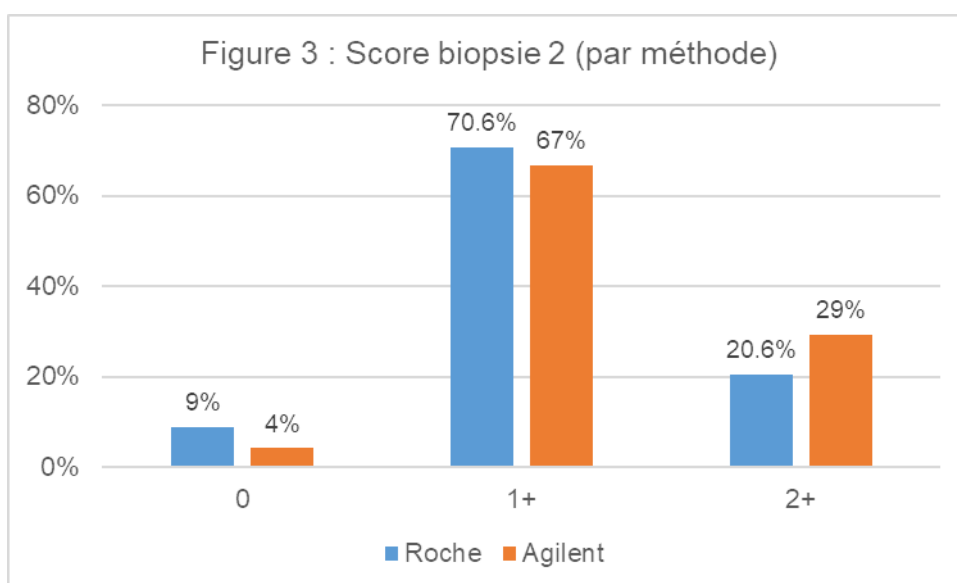
Réponses	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	33	21	1
1+	0	3	0
2+	1	0	0
3+	0	0	0



3.4.2. Score biopsie 2

Le résultat attendu pour cette biopsie était un **score 1-2+**.

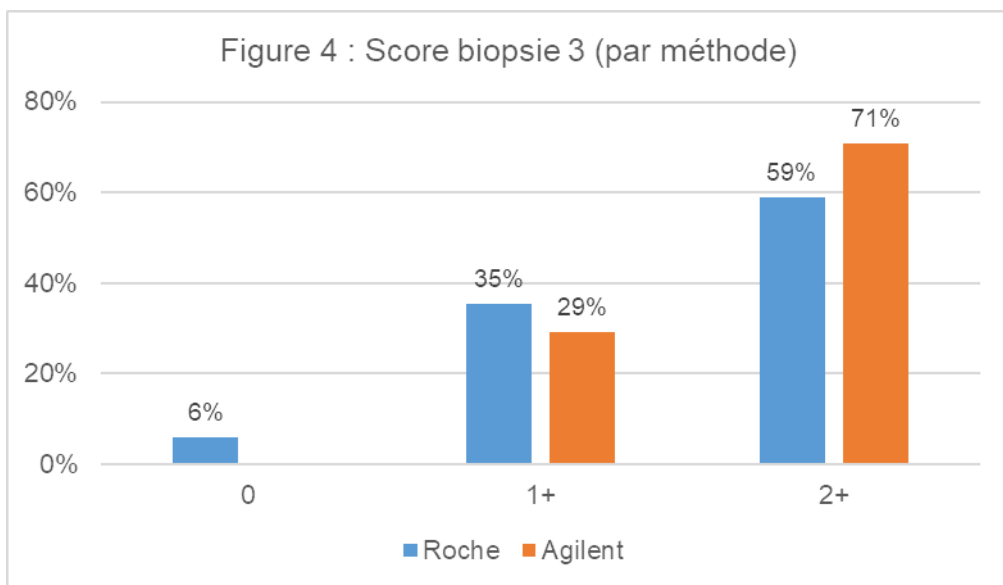
Réponses	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	3	1	0
1+	24	16	0
2+	7	7	1
3+	0	0	0



3.4.3. Score biopsie 3

Le résultat attendu pour cette biopsie était un **score 1-2+**.

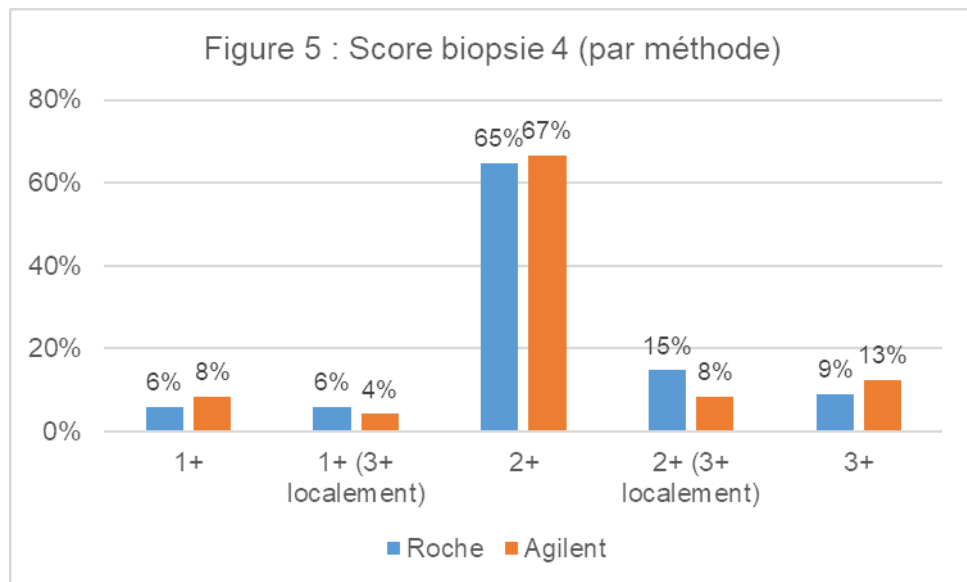
Réponses	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	2	0	0
1+	12	7	0
2+	20	17	1
3+	0	0	0



3.4.4. Score biopsie 4

Le résultat attendu pour cette biopsie était un **score 2+ (3+ localement)**.

Réponses	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	0	0	0
1+	2	2	0
1+ (3+ localement)	2	1	0
2+	22	16	1
2+ (3+ localement)	5	2	0
3+	3	3	0



3.4.5. Score biopsie 5

Le résultat attendu pour cette biopsie était un **score 3+**.

Réponses	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	0	0	0
1+	0	0	0
2+	0	0	0
3+	34	24	1

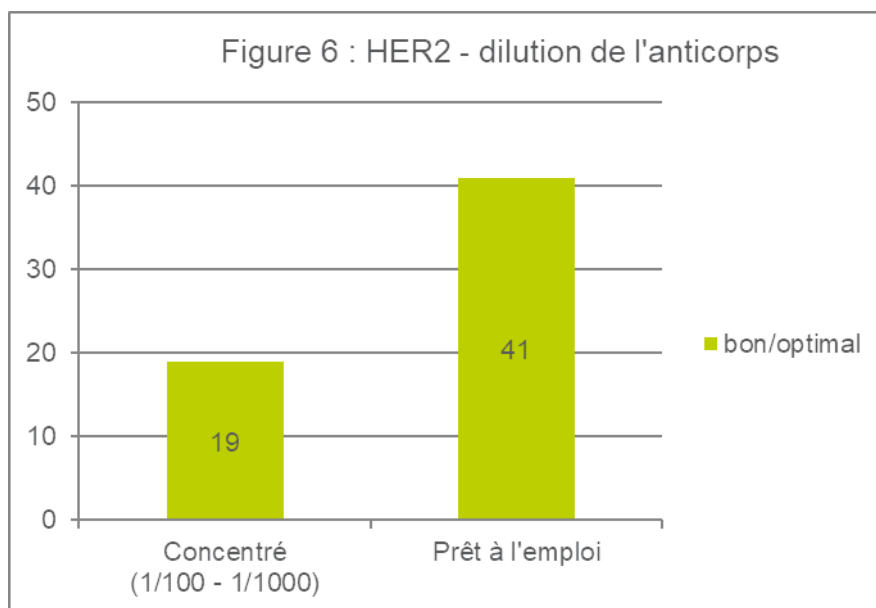
3.4.6. Guidelines utilisées pour l'interprétation des résultats

Réponses	N
ASCO/CAP Guidelines 2007	0
ASCO/CAP Guidelines 2013	0
ASCO/CAP Guidelines 2018	50
Belgian Guidelines 2007	0
Belgian Guidelines 2014	7
Autre : ASCO/CAP Guidelines 2018 / Belgian Guidelines 2007	1
Non rapporté	2

4. Discussion des résultats

4.1. HER2

- La coloration HER2 a été de qualité optimale ou bonne pour 60/60 participants (100%) (voir figure 1).
- La coloration a été réalisée par automate par tous les laboratoires.
- Une coupe de contrôle a été ajoutée par 56/60 participants (93%). La coupe de contrôle était conforme dans 100% des cas (56/56).
- Les anticorps les plus souvent utilisés sont le clone 4B5 (34/60 laboratoires soit 57%) et l'anticorps polyclonal A0485 (18/60 laboratoires soit 30%).
- Un anticorps concentré a été utilisé par 19/60 laboratoires (32%), un anticorps prêt à l'emploi par 41/60 laboratoires (68%) (voir figure 6).

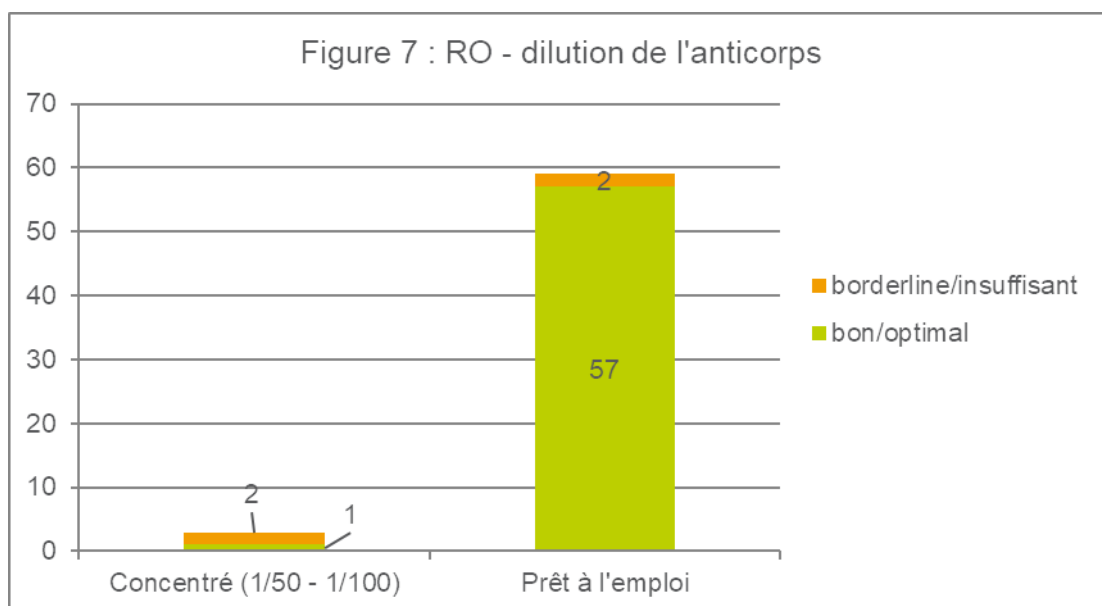


- Pour 2 laboratoires, le marquage et l'interprétation du sous-clone 3+ de la biopsie 4 (2+/amplifié) était conforme au résultat attendu, mais le marquage des autres cellules de la même biopsie ne correspondait pas avec le résultat attendu 2+/amplifié (coloration trop faible). La coloration a été évaluée comme « bonne », mais les participants ont reçu un commentaire dans leur rapport individuel.

4.2. RO

- La coloration RO a été de qualité optimale ou bonne pour 58/62 participants (94%) (voir figure 1).
- La coloration a été réalisée par automate par tous les laboratoires.
- Une coupe de contrôle a été ajoutée par 43/62 participants (69%).

- Les clones les plus souvent utilisés sont le SP1 (36/62 laboratoires soit 58%) et le EP1 (23/62 laboratoires soit 37%).
- Un anticorps concentré a été utilisé par 3/62 laboratoires (5%), un anticorps prêt à l'emploi par 59/62 laboratoires (95%) (voir figure 6).



- 2 laboratoires ont obtenu un résultat insuffisant, dont un laboratoire ayant utilisé un anticorps concentré et un laboratoire ayant utilisé un anticorps prêt à l'emploi. Ce résultat correspond dans les 2 cas à une coloration faussement positive (>1% de positivité de la biopsie 6 et/ou >10% de positivité de la biopsie 4).
- 2 laboratoires ont obtenu un résultat borderline, dont un laboratoire ayant utilisé un anticorps concentré et un laboratoire ayant utilisé un anticorps prêt à l'emploi. Ce résultat correspond dans les 2 cas à une coloration faussement négative de la biopsie 4 (<1% de positivité).
- Les tissus de contrôle recommandés par NordiQC sont le col utérin et l'amygdale. La majorité des cellules épithéliales de l'épithélium squameux et des glandes du col utérin doivent présenter une coloration modérée à forte, ainsi que la majorité des cellules stromales. Aucune coloration ne doit être observée dans les cellules endothéliales et lymphoïdes. L'amygdale peut être utilisée comme contrôle supplémentaire pour évaluer la sensibilité : au minimum une coloration faible à modérée des cellules dispersées des centres germinatifs (en général des cellules folliculaires dendritiques) et de l'épithélium squameux doit être présente. Aucune coloration ne doit être observée dans les cellules B des zones du manteau et des centres germinatifs.

4.3. INTERPRÉTATION HER2

- L'interprétation consensuelle des participants correspondait au résultat attendu pour chacune des biopsies :

Réponses	Biopsie 1	Biopsie 2	Biopsie 3	Biopsie 4	Biopsie 5
Résultat attendu	0/NA*	1-2+/NA	1-2+/NA	2+/A*	3+/A
0	93%	7%	3.5%	-	-
1+	5%	68%	32%	7%	-
2+	2%	25%	64.5%	66%	-
3+	-	-	-	27%	100%

(*) NA = non amplifié, A = amplifié

- Dans cette enquête, pour chaque biopsie, les résultats IHC et ISH sont concordants entre eux et nous n'avons pas constaté de surinterprétation dans les IHC. C'est-à-dire qu'aucune des 3 biopsies non amplifiées de cette enquête n'a été marquée et/ou interprétée comme un résultat 3+ par un laboratoire. Cependant, il reste encore obligatoire de réaliser une vérification ISH sur les biopsies scorées 3+. En effet, si la confirmation ISH des biopsies 3+ est supprimée, celles-ci sont immédiatement considérées comme HER2 positives avec le risque de surinterprétation de la tumeur et de traitement inutile du patient.
- 4 laboratoires ont rapporté une interprétation erronée 1+ pour la biopsie 4 (2+/amplifiée), alors que la coloration était techniquement correcte et conforme au score attendu 2+, avec la présence du sous clone des cellules 3+. La coloration a été évaluée comme « optimale », mais les participants ont reçu un commentaire dans leur rapport individuel.

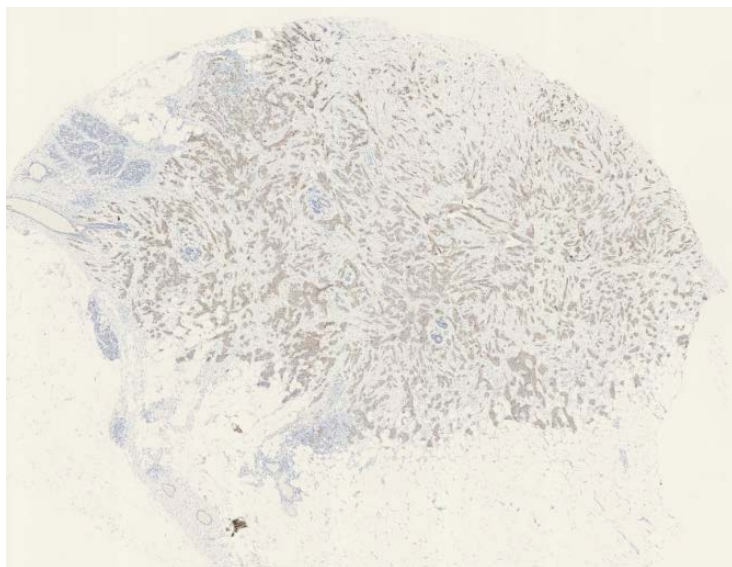
5. Images

HER2

Illustration du sous-clone des cellules 3+ dans la biopsie 4 : celui-ci n'était pas présent dans les coupes utilisées pour la libération de l'enquête, néanmoins il était présent dans toutes les coupes de tous les participants.



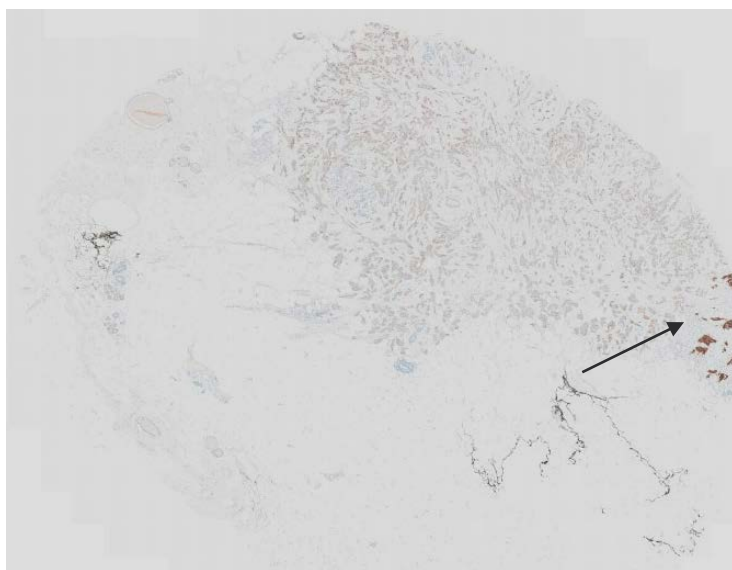
Biopsie 4 : coupe libération Roche



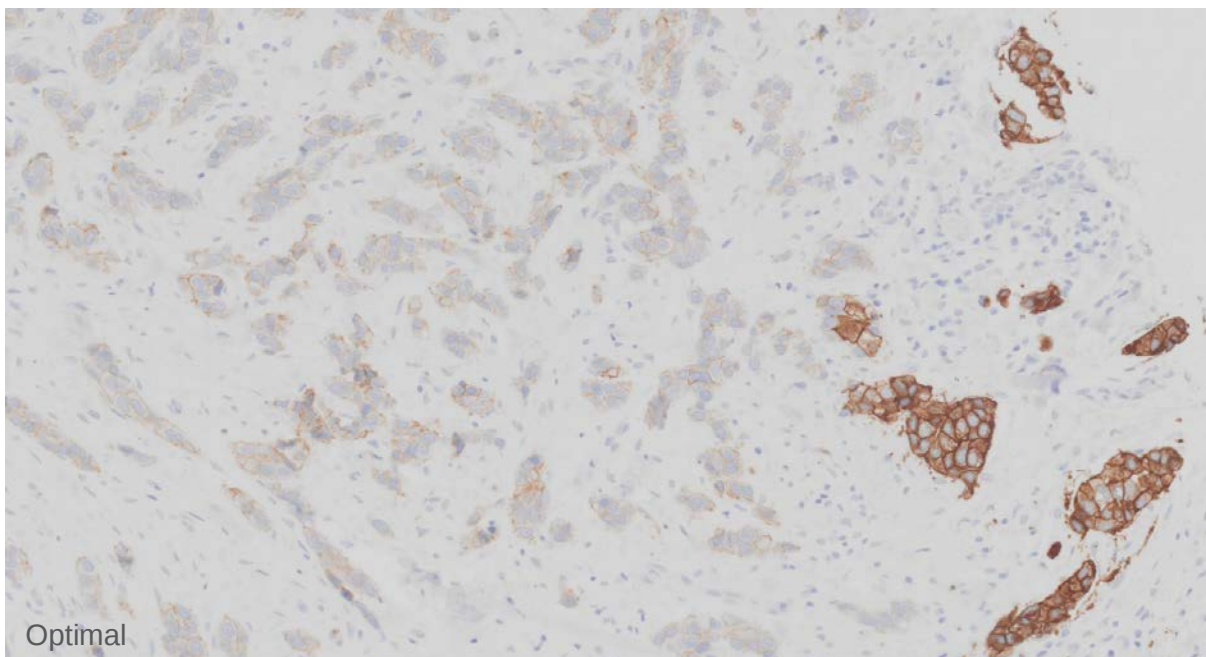
Biopsie 4 : coupe libération Agilent



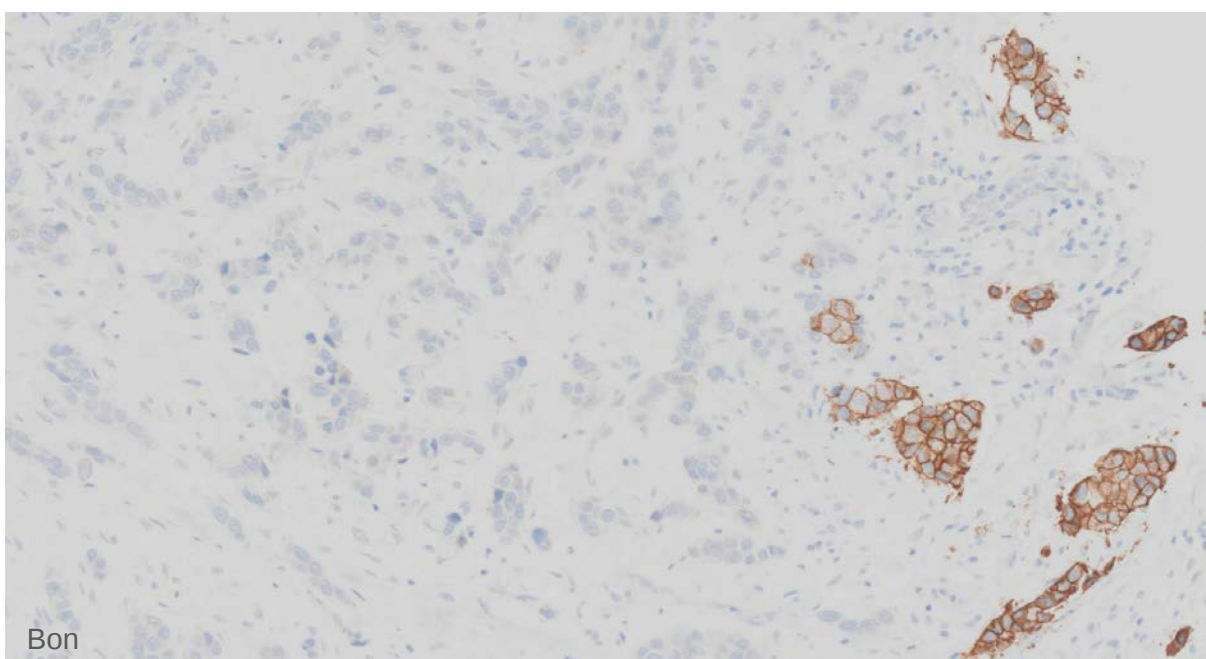
Biopsie 4 : coupe du premier participant (coupe 5)



Biopsie 4 : coupe du dernier participant (coupe 70)

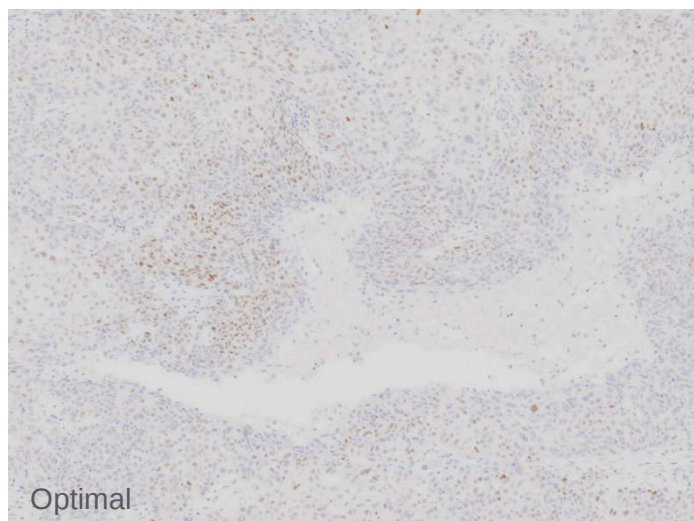


Biopsie 4 (2+/amplifiée) : marquage 2+ et le sous-clone des cellules 3+

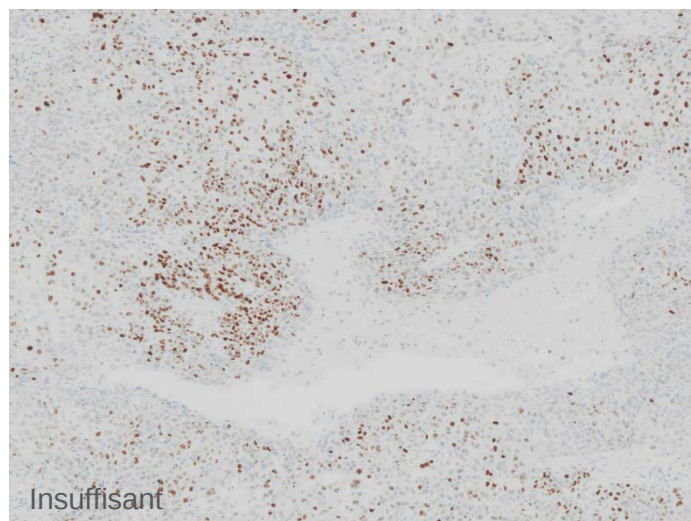


Biopsie (2+/amplifiée) : la coloration du sous-clone 3+ est conforme au résultat attendu mais la coloration des autres cellules de la même biopsie ne correspond pas avec le résultat attendu 2+/amplifié (coloration trop faible)

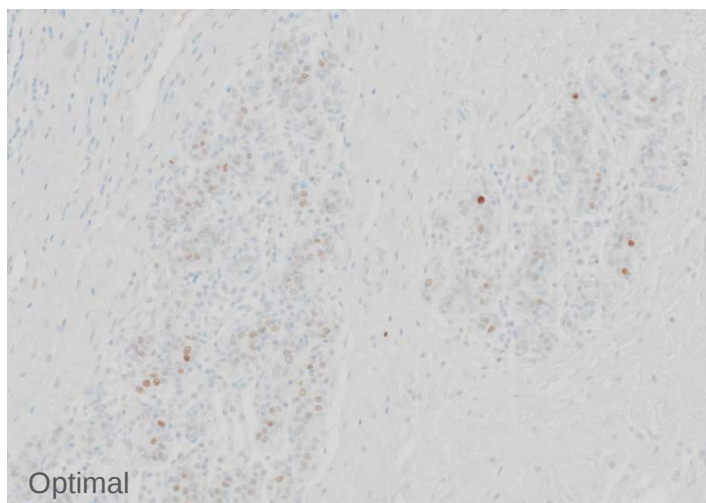
RO



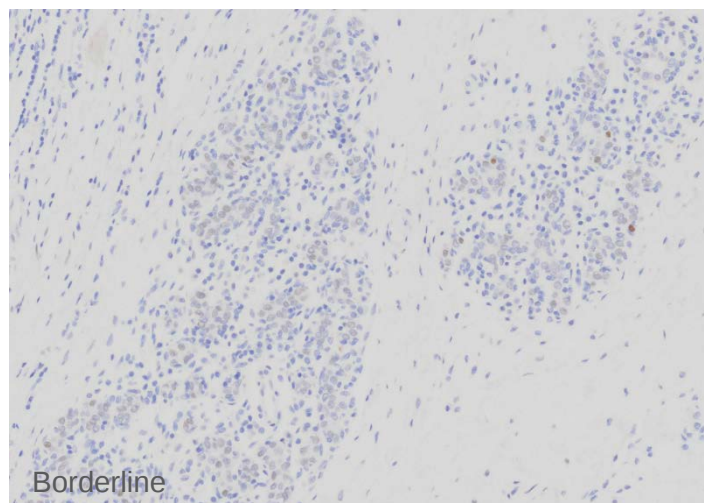
Biopsie 4 : coloration nucléaire faible de 1-10% des cellules tumorales (expression faible)



Biopsie 4 : coloration faussement positive (>10% de positivité)



Biopsie 4 : coloration nucléaire faible de 1-10% des cellules tumorales (expression faible)



Biopsie 4 : coloration faussement négative (<1% de positivité)

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2022.

Ce rapport ne peut pas être reproduit, publié ou distribué sans l'accord de Sciensano. Les résultats individuels des laboratoires sont confidentiels. Ils ne sont transmis par Sciensano ni à des tiers, ni aux membres de la Commission, des comités des experts ou du groupe de travail EEQ.