

**EXPERTISE EN DIENSTVERLENING
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

**COMMISSIE VOOR PATHOLOGISCHE ANATOMIE
WERKGROEP EKE**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE VOOR
ANALYSES PATHOLOGISCHE ANATOMIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT
IMMUNOHISTOCHEMIE – HER2/PR
ENQUETE 2020/3**

Sciensano/Immunohistochemie/11-NL

Expertise en dienstverlening
Kwaliteit van laboratoria
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.sciensano.be

WERKGROEP EKE

Sciensano	
Secretariaat	TEL: 02/642.55.22 FAX: 02/642.56.45
Vanessa Ghislain	Enquêtecoördinator TEL: 02/642.52.08 e-mail: Vanessa.Ghislain@sciensano.be
Anne Marie Dierick	Vervanger enquêtecoördinator TEL: 02/642.53.95 e-mail: AnneMarie.Dierick@sciensano.be
Leden werkgroep EKE	Instelling
Gabriela Beniuga	IPG (Gosselies)
Cecile Colpaert	AZ (Turnhout)
Bart De Wiest	OLV (Aalst)
Bart Lelie	AZ-ZENO (Knokke-Heist)
Caroline Fervaille	CHU UCL (Namur)

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de leden van de werkgroep EKE op: 06/01/2021.

Dit rapport werd besproken in de vergadering van de werkgroep EKE van: 12/01/2021.

Autorisatie verspreiding rapport: Door Vanessa Ghislain, enquêtecoördinator, op 27/01/2021.

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:
https://www.wiv-isp.be/QML/Anapath/external_quality/rapporten/ nl/rapporten.htm

INHOUDSTAFEL

1. Inleiding	4
1.1. Doel van de EKE	4
1.2. Uitbestede activiteiten	4
1.3. Materiaal van de EKE	4
1.4. Vraag	4
1.5. Antwoordformulier	4
2. Beoordeling	5
2.1. Algemene criteria	5
2.2. Specifieke criteria per epitoom	5
2.2.1. HER2	5
2.2.2. PR	6
2.3. Eindbeoordeling	6
2.3.1. HER2	6
2.3.2. PR	6
3. Resultaten	7
3.1. Deelname aan de EKE	7
3.2. Overzicht van de resultaten	7
3.3. Resultaten per antilichaam	8
3.3.1. HER2	8
3.3.2. PR	8
4. Bespreking van de resultaten	9
4.1. HER2	9
4.2. PR	10
5. Beelden	11

1. Inleiding

Dit document bestaat uit een overzicht en een bespreking van de resultaten van de externe kwaliteitsevaluatie (EKE) Immunohistochemie 2020/3 (HER2/PR) en een samenvatting van de individuele opmerkingen en aanbevelingen.

1.1. DOEL VAN DE EKE



Deze EKE had als doel de kwaliteit van de immunohistochemische kleuringen HER2 en PR (progesteron receptor) te evalueren.

1.2. UITBESTEDE ACTIVITEITEN

Het weefselmateriaal is afkomstig van het laboratorium pathologische ontleedkunde van het OLV ziekenhuis te Aalst. De cellijnen zijn afkomstig van HistoCyte Laboratories.

1.3. MATERIAAL VAN DE EKE

Het opgestuurde materiaal bestond uit 2 ongekleurde paraffinecoupes met 1) punchbiopten afkomstig van operatiestukken en 2) FFPE cellijnen. De biopten bestonden zowel uit normale weefsels als uit klinisch relevante tumoren en toonden een verschillend niveau van proteïne-expressie (hoog, gemiddeld, laag, geen expressie).

		HER2		PR
Biopten		1) Borstcarcinoom 2) Borstcarcinoom 3) Borstcarcinoom 4) Borstcarcinoom 5) Borstcarcinoom		1) Cervix 2) Tonsil 3) Borstcarcinoom 4) Borstcarcinoom 5) Borstcarcinoom 6) Borstcarcinoom
Cellijnen	A B C D	A) Borst adenocarcinoom B) Borst adenocarcinoom C) Maag adenocarcinoom D) Borst adenocarcinoom	A B C D	A) Ductaal carcinoom B) Borst adenocarcinoom C) Ductaal carcinoom D) Ductaal carcinoom

De homogeniteit van de stalen werd getest door het laboratorium pathologische ontleedkunde van het OLV ziekenhuis te Aalst. De homogeniteit werd nagegaan door microscopische controle van de immunohistochemische kleuring op meerdere niveaus (uitgevoerd elke 30 coupes). De stalen werden beschouwd als homogeen (in die zin dat elk panel van 2 coupes identieke informatie bevat) en stabiel tot het einde van de analyseperiode.

1.4. VRAAG

Er werd gevraagd om de coupes te kleuren voor HER2 en PR volgens de standaardprocedures van het laboratorium. Een eigen controle(coupe) kon worden toegevoegd (controle extern aan het te testen weefsel); voor HER2 diende de controle verplicht mee opgestuurd te worden. Er werd gevraagd om de stalen te behandelen zoals patiëntenstalen, d.w.z. dat de stalen dienden geïntegreerd te worden in de routine samen met patiëntenstalen.

1.5. ANTWOORDFORMULIER

Er werd gevraagd een antwoordformulier in te vullen betreffende de gebruikte technieken. Dit formulier werd opgesteld door de enquêtecoördinator en werd meegestuurd met de coupes.

2. Beoordeling

De evaluatie van de coupes werd gezamenlijk en simultaan uitgevoerd door 3 externe anatoom-pathologen en door de enquêtecoördinator, Vanessa Ghislain (Sciensano). De evaluatie vond plaats op 9 november 2020 in het UZ Gent. Voor bijkomende anonimisatie werden de coupes niet geïdentificeerd aan de hand van hun deelnemersnummer (QMLxxx), maar d.m.v. een willekeurig nummer enkel gekend door de EKE coördinator. Deze administratieve en wetenschappelijke structuur garandeert de kwaliteit en de anonimiteit van de resultaten. Voor HER2 werden ook de controles beoordeeld (zie verder).

2.1. ALGEMENE CRITERIA

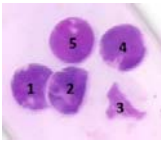

Algemeen is de beoordeling gebaseerd op :

- **de specificiteit** : er moet een voldoende en specifiek signaal aanwezig zijn;
- **de achtergrond** : in principe mag een immunohistochemische kleuring geen specifieke achtergrond genereren;
- **de morfologie** : de kleuring mag de morfologie zo weinig mogelijk wijzigen.

2.2. SPECIFIEKE CRITERIA PER EPITOOOP

2.2.1. HER2

Biopten en cellijnen :

			IHC	ISH (ratio)
Biopten*	1. Borstcarcinoom 2. Borstcarcinoom 3. Borstcarcinoom 4. Borstcarcinoom 5. Borstcarcinoom		1) 0 2) 1+ 3) 2+ 4) 2+ 5) 3+	1) Not amplified (0.94) 2) Not amplified (1.38) 3) Not amplified (1.29) 4) Not amplified (1.95) 5) Amplified (9.52)
Cellijnen	A. Borst adenocarcinoom B. Borst adenocarcinoom C. Maag adenocarcinoom D. Borst adenocarcinoom		A) 0 B) 1+ C) 2+ D) 3+	A) Not amplified B) Not amplified C) Equivocal D) Amplified

(*) IHC kleuringen uitgevoerd in OLV Aalst (antilichaam 4B5, Roche), scoring volgens de 2018 ASCO/CAP guidelines.

Beoordeling controleweefsel van het laboratorium :

Controleweefsel aanwezig?	Conform de richtlijnen*?	Richtlijnen*
Ja / Neen	Conform / Niet conform	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. PR

Biopten :

- 1) **Cervix** : matig tot sterke nucleaire aankleuring van columnair epitheel en van de meeste stromale cellen (uitgezonderd endotheliale en lymfoïde cellen); minstens zwakke nucleaire aankleuring van basaal squameus epitheel
- 2) **Tonsil** : geen nucleaire aankleuring in de tonsil
- 3) **Borstcarcinoom** : geen nucleaire aankleuring in de tumorale cellen, aankleuring in enkele normale klierbuizen
- 4) **Borstcarcinoom** : sterke nucleaire aankleuring in ongeveer 90% van de tumorale cellen
- 5) **Borstcarcinoom** : nucleaire aankleuring in maximum 10% van de tumorale cellen
- 6) **Borstcarcinoom** : nucleaire aankleuring in maximum 1% van de tumorale cellen

Cellijnen :

- A) **Ductaal carcinoom** : negatief
- B) **Borst adenocarcinoom** : zwak/matig positief
- C) **Ductaal carcinoom** : matig/sterk positief
- D) **Ductaal carcinoom** : sterk positief

2.3. EINDBEOORDELING

2.3.1. HER2

- **Optimaal** : de kleuring van biopt 3 en biopt 4 komt overeen met een score 1+ of 2+; er is geen of maximaal zwakke cytoplasmatische aankleuring die niet interfereert met de interpretatie van de membranaire aankleuring
- **Goed** : vals positieve aankleuring (bv. de kleuring van biopt 2 komt overeen met een score 2+) of algemeen weinig intense membranaire aankleuring of er is cytoplasmatische aankleuring die interfereert met de interpretatie van de membranaire aankleuring of te zwakke tegenkleuring
- **Borderline** : één van de cellijnen is vals negatief; optimalisatie van het protocol is nodig
- **Onvoldoende** : de kleuring van biopt 3 of biopt 4 komt overeen met een score 0; optimalisatie van het protocol is dringend nodig

2.3.2. PR

- **Optimaal** : de kleuring komt overeen met de criteria hierboven beschreven (zie 2.2.2.)
- **Goed** : algemeen matige aankleuring of cytoplasmatische aankleuring of te zwakke tegenkleuring
- **Borderline** : vals positieve aankleuring in het endotheel van het cervixbiopt of $\geq 10\%$ nucleaire aankleuring van de B-cellen in de kiemcentra van de tonsil of onvoldoende aankleuring in meerdere biopten of cytoplasmatische aankleuring die interfereert met de interpretatie; optimalisatie van het protocol is nodig
- **Onvoldoende** : vals negatieve of vals positieve aankleuring in één van de borstbiopten (geëvalueerd over het geheel van de glaasjes); optimalisatie van het protocol is dringend nodig

3. Resultaten

3.1. DEELNAME AAN DE EKE

Het deelnamepercentage bedroeg 67/69 (97%).

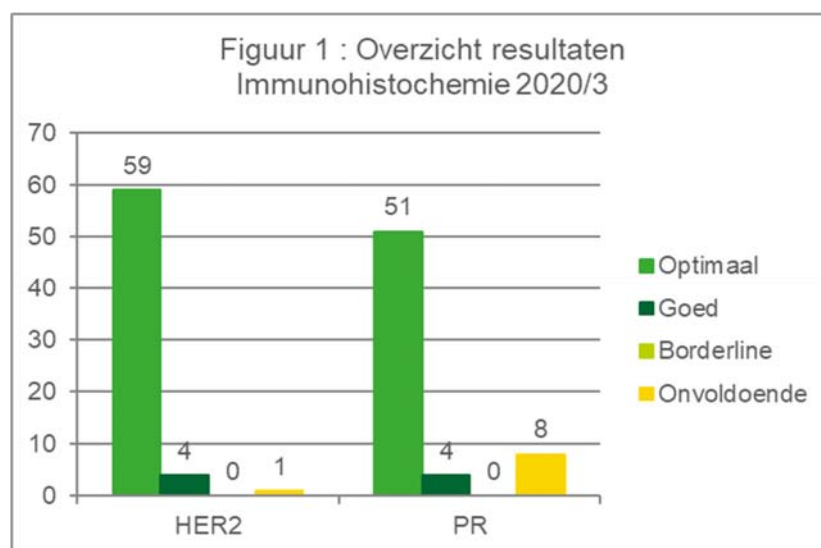
Gewest	Aantal laboratoria dat stalen ontving (ingeschrevenen)	Aantal laboratoria dat een HER2 coupe terugstuurde	Aantal laboratoria dat een PR coupe terugstuurde
Vlaams gewest	42	41	42
Brussels gewest	10	8	8
Waals gewest	15	15	15
Farm. firma's	2	2	2
Totaal	69	66	67

3.2. OVERZICHT VAN DE RESULTATEN

De farmaceutische firma's (producenten van antilichamen, zie ook 3.1) werden niet opgenomen in de resultaten.

Eindresultaat	HER2	PR
Optimaal	59 (92%)	51 (81%)
Goed	4 (6%)	4 (6%)
Borderline	0	0
Onvoldoende	1 (2%)	8 (13%)
Totaal	64	63*

(*) De PR kleuring was bij 2 laboratoria niet beoordeelbaar (zie 4.2).



3.3. RESULTATEN PER ANTILICHAAM

3.3.1. HER2

De farmaceutische firma's (producenten van antilichamen, zie ook 3.1) werden niet opgenomen in de resultaten.

HER2 2020/3							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 23)							
Polyclonaal	22	Dako/Agilent Technologies	21	0	0	1	95%
Niet vermeld	1	Enzo	1	0	0	0	1/1
Ready-To-Use antilichamen (n = 41)							
rm 4B5	39	Cell Marque/Ventana/Roche	36	3	0	0	100%
mm CB11	1	Leica/Novocastra	0	1	0	0	1/1
Polyclonaal HercepTest	1	Dako/Agilent Technologies	1	0	0	0	1/1

(*) optimaal/goed

mm = mouse monoclonaal antilichaam

rm = rabbit monoclonaal antilichaam

3.3.2. PR

De farmaceutische firma's (producenten van antilichamen, zie ook 3.1) werden niet opgenomen in de resultaten.

PR							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 3)							
mm 16	1	Leica/Novocastra	1	0	0	0	1/1
mm 16 + SAN27	1	Leica/Novocastra	1	0	0	0	1/1
mm PgR 1294	1	Dako/Agilent Technologies	1	0	0	0	1/1
Ready-To-Use antilichamen (n = 60)							
rm 1E2	37	Cell Marque/Ventana/Roche	26	3	0	8	78%
mm PgR 1294	14	Dako/Agilent Technologies	14	0	0	0	100%
mm PgR 636	7	Dako/Agilent Technologies	7	0	0	0	100%
rm 1G2	1	Cell Marque/Ventana/Roche	1	0	0	0	1/1
mm 16	1	Leica/Novocastra	0	1	0	0	1/1

(*) optimaal/goed

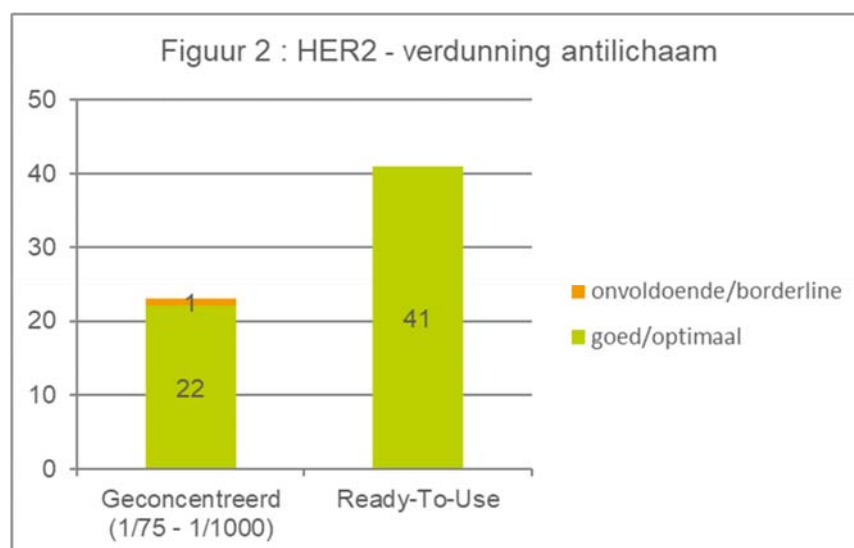
mm = mouse monoclonaal antilichaam

rm = rabbit monoclonaal antilichaam

4. Bespreking van de resultaten

4.1. HER2

- In deze EKE was de samenstelling van de multiblok suboptimaal. Er was geen HER2 2+ tumor met genamplificatie aanwezig, aangezien na controle is gebleken dat biopt 4, initieel geëvalueerd als '2+/amplified', in werkelijkheid niet geamplificeerd was. Dit kan van invloed zijn geweest op het hoge algemene slaagpercentage van 98%.
- De HER2 kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 63/64 deelnemers (98%) (zie figuur 1).
- De kleuring werd door alle laboratoria uitgevoerd d.m.v. een automaat.
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 63/64 deelnemers (98%). De controlecoupe was conform in 59/63 (94%) gevallen.
- De meest gebruikte antilichamen zijn kloon 4B5 (39/64 laboratoria of 61%) en het polyclonaal antilichaam A0485 (22/64 laboratoria of 34%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd door 23/64 laboratoria (36%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam door 41/64 laboratoria (64%) (zie figuur 2).



- Eén laboratorium behaalde een onvoldoende resultaat, ten gevolge van een score 0 voor biopt 4 (2+/not amplified).
- De coupes werden bijkomend gekleurd door NordiQC (HercepTest, Agilent, polyclonaal antilichaam en Pathway, Roche, 4B5 rabbit monoclonaal antilichaam).

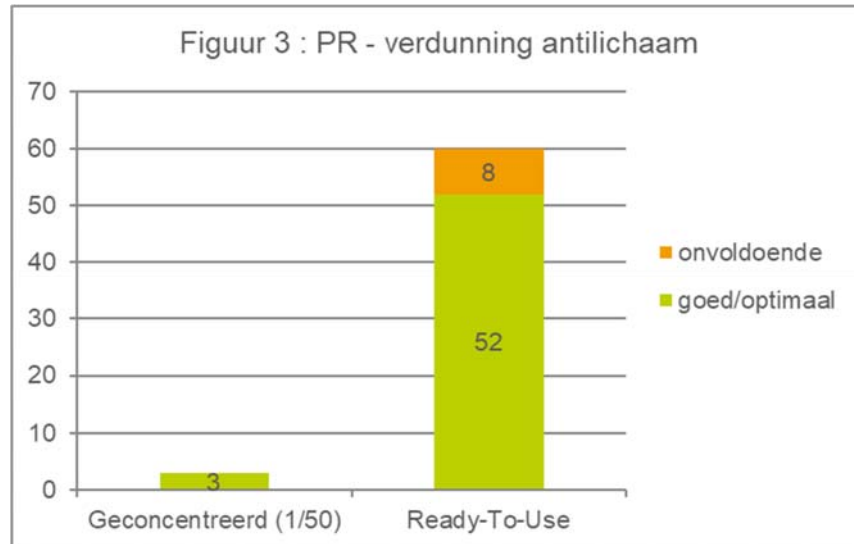
In het kader van de kwaliteit en de kwaliteitsbewaking van de HER2 testen, wensen wij nogmaals het belang te benadrukken van :

- het correct toepassen van de **nationale adviezen en richtlijnen**;
- het **optimaliseren** van de methoden, bv. aan de hand van de door NordiQC aanbevolen protocollen (<https://www.nordiqc.org/recommended.php>) en in samenspraak met de provider van uw antilichaam;
- het uitvoeren van een ingangscntrole op gevalideerd controlemateriaal (met minstens een tumor met IHC score 2+) vóór ingebruikname van een **nieuw lot** van het antilichaam; voor **geconcentreerde antilichamen** : als de concentratie van het nieuwe lot niet overeenstemt met de concentratie van het lot dat in gebruik is, is een verificatie van het nieuwe lot met een seriële verdunning nodig om de verdunningsfactor te verifiëren; indien u hierover nog vragen heeft, gelieve de provider van uw antilichaam te contacteren; zie ook de Praktijkrichtlijn;

- het toevoegen van representatief **controleweefsel** op elk glaasje zoals beschreven in de richtlijnen;
 - het periodiek evalueren van **kwaliteitsindicatoren** zoals de correlatie tussen IHC en ISH en het percentage HER2 positieve borstcarcinomen van de eigen patiëntenpopulatie.
- Het valideren van de protocollen vergt een voortdurende inspanning van de laboratoria, maar is nodig om de betrouwbaarheid van de farmaco-predictieve testen te blijven garanderen.

4.2. PR

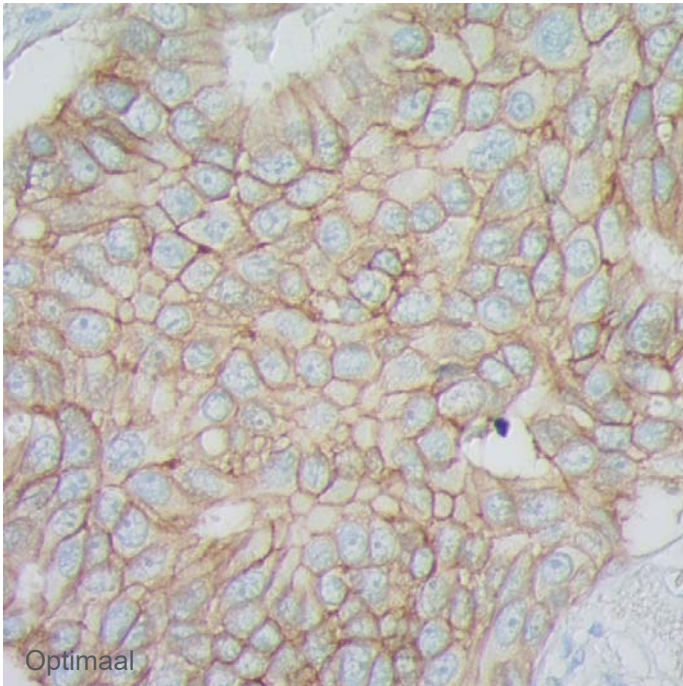
- De PR kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 55/63 deelnemers (87%) (zie figuur 1).
- Bij 2/65 deelnemers was de PR kleuring niet beoordeelbaar :
 - wegens een (vermoeden van) technisch probleem bij borstbiopten 5 en 6;
 - wegens afwezige tegenkleuring.
- De kleuring werd door alle laboratoria uitgevoerd d.m.v. een automaat.
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 43/63 deelnemers (68%).
- De meest gebruikte klonen zijn 1E2 (37/63 laboratoria of 59%), PgR 1294 (15/63 laboratoria of 24%) en PgR 636 (7/63 laboratoria of 11%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd door 3/63 laboratoria (5%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam door 60/63 laboratoria (95%) (zie figuur 3).



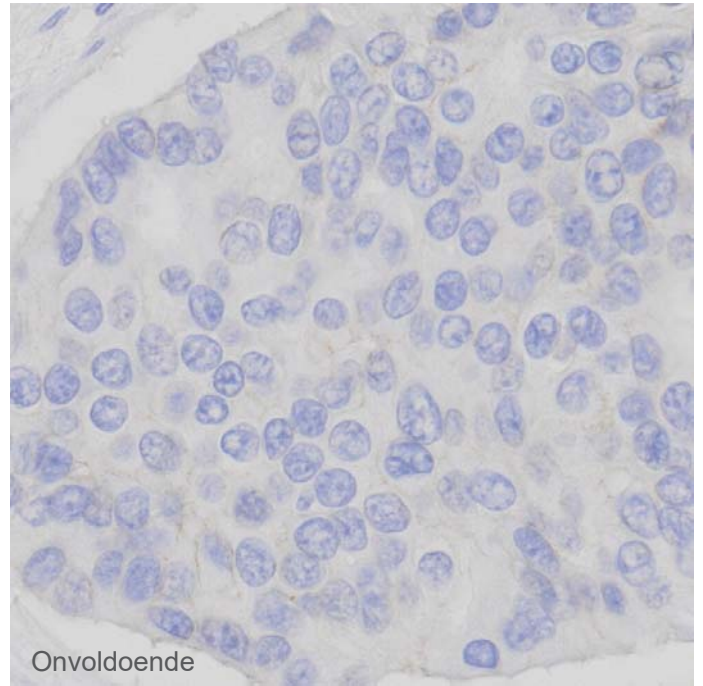
- Een onvoldoende resultaat werd in alle gevallen (8/8) getypeerd door vals positieve aankleuring (>1% positiviteit) van biopt 6.
- De coupe werd bijkomend gekleurd door NordiQC (kloon PgR 1294, Agilent, mouse monoclonaal antilichaam).
- Cervix wordt door NordiQC aanbevolen als positieve controle voor de evaluatie van de sensitiviteit van de PR kleuring. Bijna alle columnair epitheel en de stromale cellen moeten matig tot sterk aankleuren, met slechts een minimale cytoplasmatische aankleuring. Basaal squameus epitheel moet minstens zwak aankleuren (een lagere PR-expressie in het plaveiselcelepitheel van de cervix van post-menopauzale vrouwen is mogelijk). Endotheliale en lymfoïde cellen mogen niet aankleuren. Tonsil kan gebruikt worden als negatieve controle : er mag geen nucleaire aankleuring aanwezig zijn.

5. Beelden

HER2

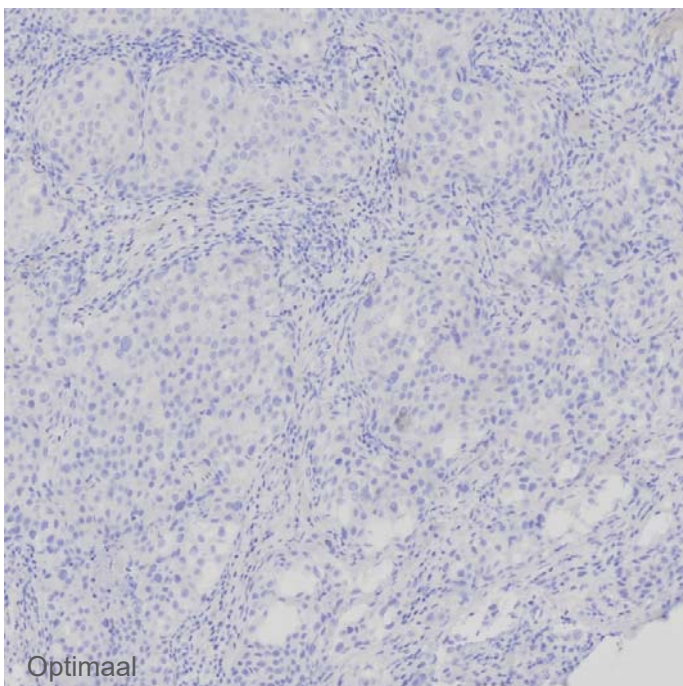


Biop 4 (2+/not amplified)

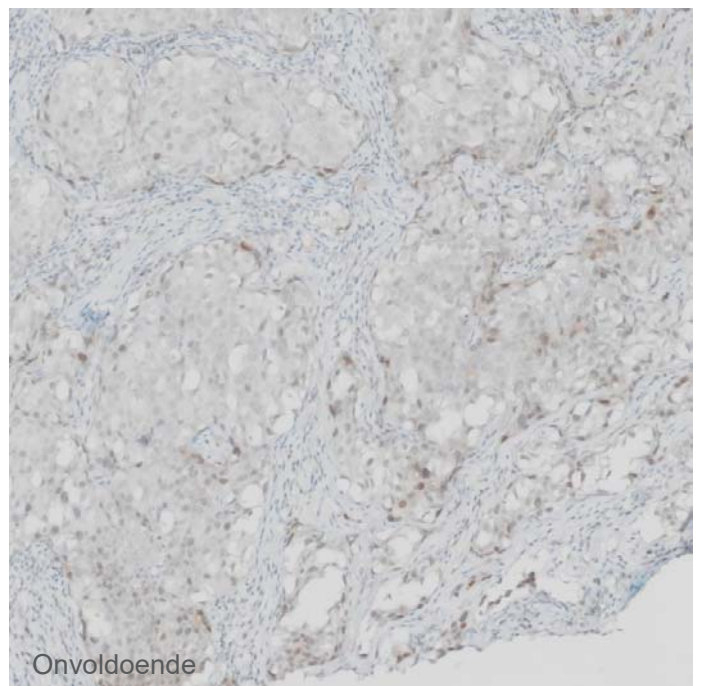


Biop 4 (2+/not amplified) : geen aankleuring of zwakke, incomplete membraire aankleuring in $\leq 10\%$ van de tumorcellen (score 0)

PR



Biop 6 : nucleaire aankleuring in maximum 1% van de tumorale cellen



Biop 6 : de kleuring is vals positief (>1% positiviteit)

EINDE

© Sciensano, Brussel 2021.

Dit rapport mag niet gereproduceerd, gepubliceerd of verdeeld worden zonder akkoord van Sciensano. De individuele resultaten van de laboratoria zijn vertrouwelijk. Zij worden door Sciensano niet doorgegeven aan derden, noch aan de leden van de Commissie, de expertencomités of de werkgroep EKE.