sciensano

levenslang gezond

VALIDATIE VAN ONDERZOEKSMETHODEN

Van toepassing op de laboratoria voor Pathologische Anatomie

Hannelien Verbeke

Dienst Kwaliteit van laboratoria

17 november 2018

.be

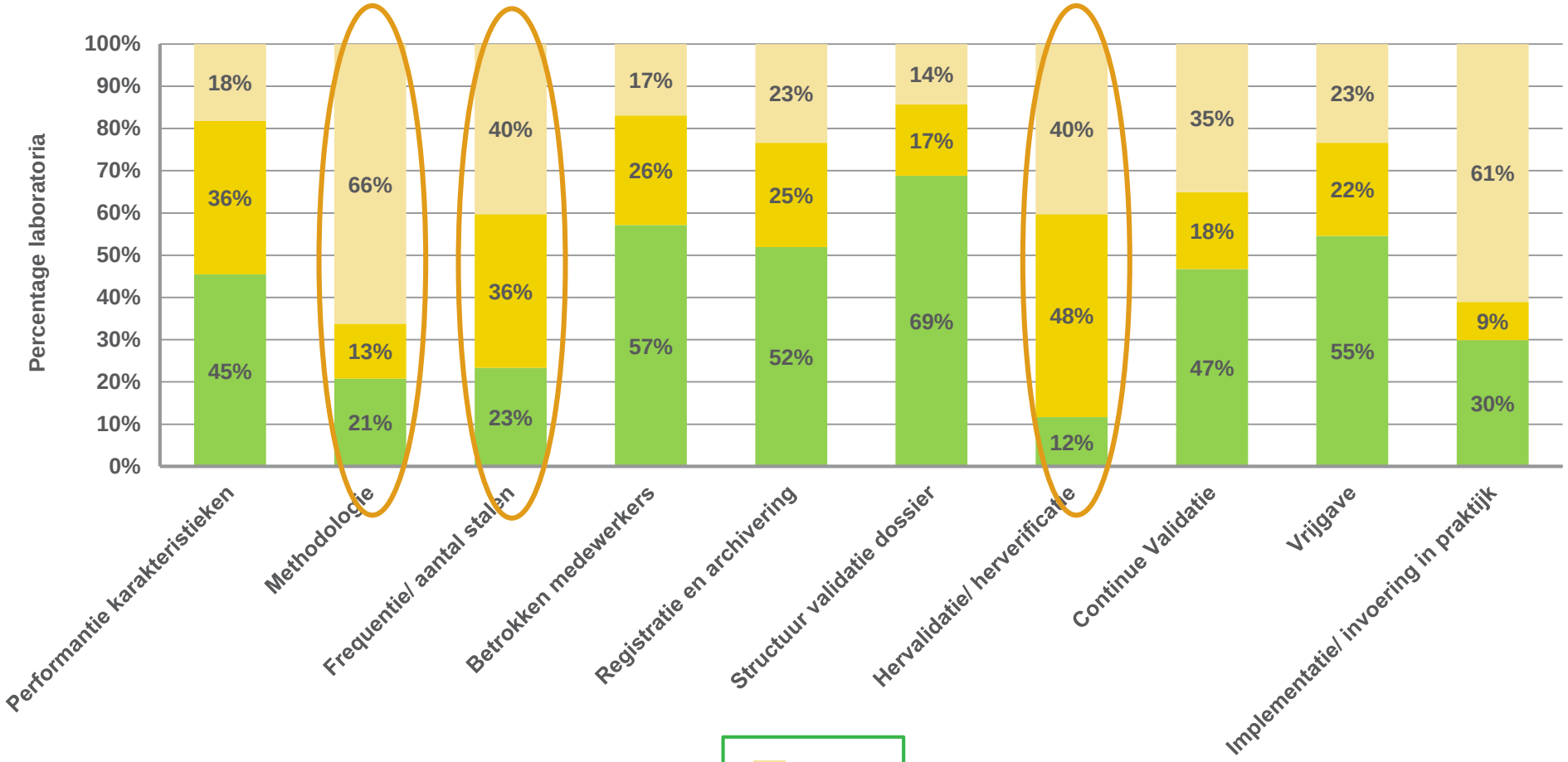
Documentaire audit

- Procedure validatie van onderzoeksmethoden
- Validatiedossier

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden



0
0.5
1

n = 77

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Performantiekarakteristieken en methodologie

Nauwkeurigheid / Accuraatheid

Juistheid

- ✓ Vergelijking met gekende testresultaten van gevalideerde methode
- ✓ Vergelijkingsstudie met andere gevalideerde techniek, toestel, reagentia
- ✓ Derdelijnscontrole
- ✓ Populatiestudie

Precisie

- ✓ Herhaalbaarheidsstudie (intrarun testen)
- ✓ Intermediaire precisie (interrun testen)
- ✓ Reproduceerbaarheidsstudie (interlaboratorium reproduceerbaarheid)

Procedure validatie van onderzoeksmethoden
Performantiekarakteristieken en methodologie

Sensitiviteit

Analytisch
(kwantitatief)

LOD

Diagnostisch
(kwalitatief)

Positieve en zwak positieve stalen

Specifieke positieve aankleuring zonder achtergrondkleuring

Specificiteit

Analytisch
(kwanitatief)

Interferentiestudie (kruisreactivitieit)

Diagnostisch
(kwalitatief)

Negatieve stalen

Geen aankleuring

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Performantiekarakteristieken en methodologie

- **Robuustheid**
  - ✓De warme ischemie periode vóór de fixatie
  - ✓Fixatieduur
  - ✓Soort fixatie
  - ✓Soort voorbehandeling van de stalen
  - ✓Dikte van de coupes
  - ✓Bepaling stabiliteit antigen
  - ✓Bepaling stabiliteit van reagentia
  - ✓...
- **Interpersonele tuning**

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Methodologie

Performantie karakteristieken	Gestandaardiseerde onderzoeks-methoden	Gewijzigde onderzoeks-methoden (“off-label”)	In eigen beheer ontwikkelde onderzoeks-methoden
Juistheid	x	x	x
Precisie	x	x	x
Sensitiviteit		x	x
Specitiviteit		x	x
Robuustheid	x	x	x
Interpersonele tuning	(x)	(x)	(x)

sciensano

Verificatie

Validatie

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Methodologie

Performantie karakteristieken	Gestandaardiseerde onderzoeks-methoden	Gewijzigde onderzoeks-methoden (“off-label”)	In eigen beheer ontwikkelde onderzoeks-methoden
Juistheid	x	x	x
Precisie	x	x	x
Sensitiviteit		x	x
Specitiviteit		x	x
Robuustheid	x	x	x
Interpersonele tuning	(x)	(x)	(x)

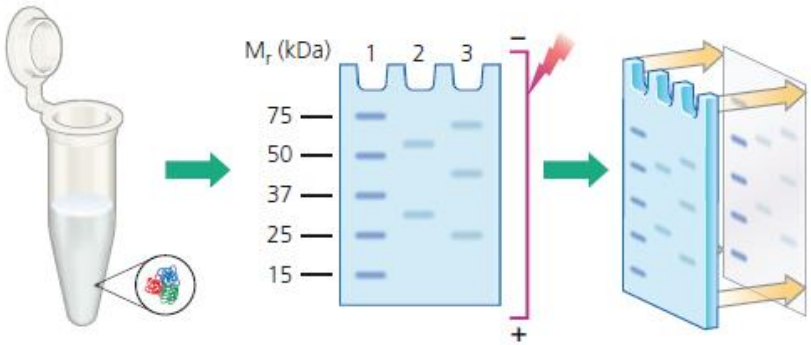
Toestelvalidatie

sciensano

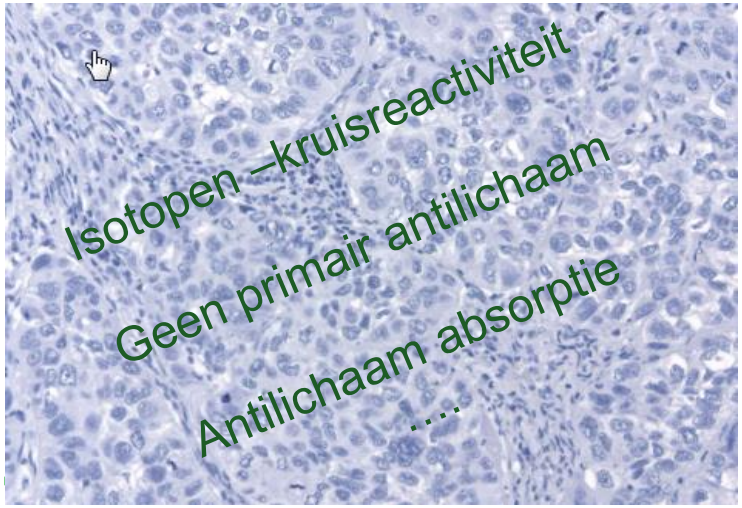
.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden
Methodologie

Western Blot

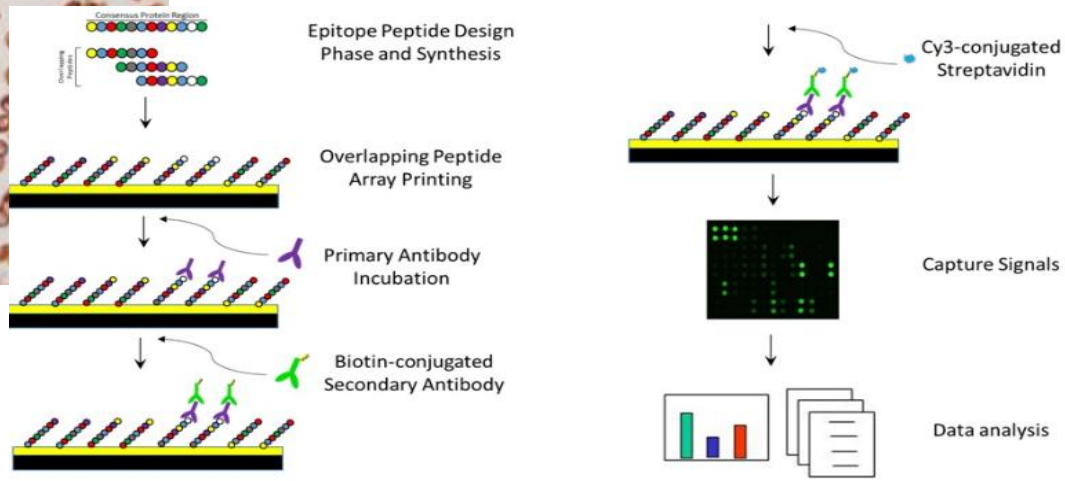


Negatieve controletesten



Positieve controletesten

Epitoop mapping



sciensano

Procedure validatie van onderzoeksmethoden
Frequentie en aantal stalen

- Afhankelijk van methode
- Afhankelijk van hoeveelheid geschikt materiaal
- Literatuur (immunohischemische onderzoeksmethoden):

Soort test	Aantal stalen
Niet-predictieve immunohistochemische test	10 positieve en 10 negatieve
Predictieve immunohistochemische test	20 positieve en 20 negatieve

Fitzgibbons et al. Arch Pathol Lab Med. 2014

Risicoanalyse

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden
Frequentie en aantal stalen

- In literatuur niet duidelijk vastgelegd hoeveel stalen per te evalueren performantiekarakteristiek

  10/10 niet-predictieve merkers en 20/20 predictieve merkers

  → Juistheid, sensitiviteit en specificiteit

- Precisie

  1 positief staal
  1 zwak positief staal
  1 negatief staal

  } X 3

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Hervalidatie

Wijziging	Aantal stalen	Performantie-karakterisitek
Lotnummer	1 positief 1 zwak positief (predictieve merker) 1 negatief	Juistheid
Verdunningsfactor antilichaam	2 positieve 2 negatieve	Juistheid
Incubatietijd antilichaam	2 positieve 2 negatieve	Juistheid
Voorbehandelingstijd	2 positieve 2 negatieve	Juistheid
Fabrikant/leverancier (= kloon)	2 positieve 2 negatieve	Juistheid

sciensano

.be

Procedure validatie van onderzoeksmethoden Hervalidatie

Wijziging	Aantal stalen	Performantie-karakterisitek
Soort fixatief	Selectief panel van predictieve en niet-predictieve merkers met verschillende expressiepatronen:	Juistheid
Weefeldoorvoering		Juistheid
Voorbehandelingsmethode (bv. pH, buffer)		Juistheid
Antigen detectiesysteem		Juistheid
Analysetoestel	1 positief 1 zwak positief 1 negatief } x3	Juistheid **+ precisie**
Omgevingscondities (bv. herlocatie)		Juistheid **+ precisie**
Watertoevoer	- Cytoplasmatische	Juistheid
Onderhoud/Defect toestel	⇩	Juistheid **+ precisie**
Upgrade/update toestelsoftware	**Risicoanalyse**	Juistheid
Afwijkende EKE resultaten		Optimalisatie + Juistheid

Procedure validatie van onderzoeksmethoden
Hervalidatie

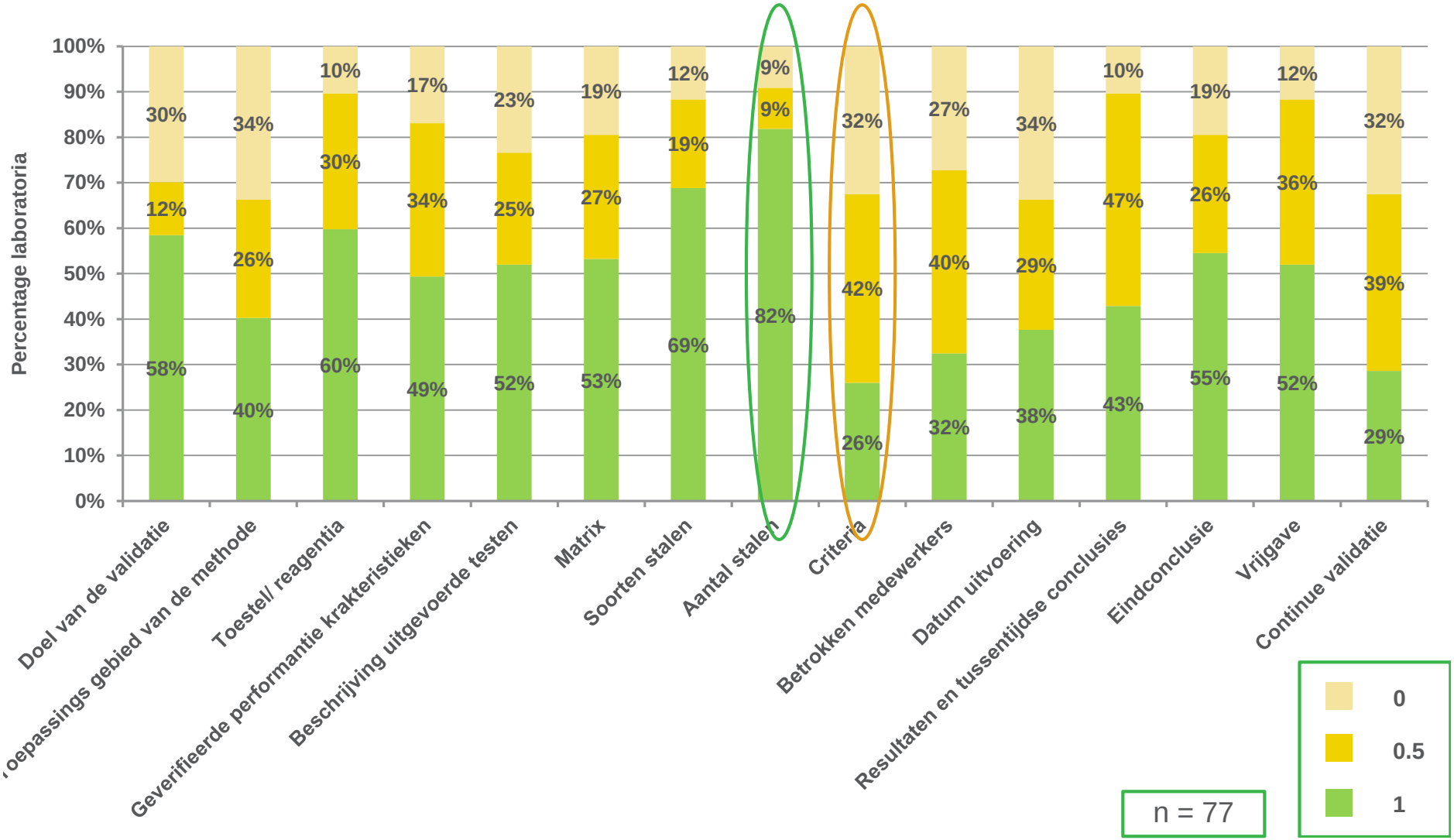
Wijziging kloon

↓

Volledige hervalidatie

(= initiële verificatie/validatie)

Validatiedossier



Validatiedossier
Initiële test

Uitgangsprotocol	
☐ Aanbevolen door NordiQC ☐ Aanbevolen door leverancier ☐ Aanbevolen door extern labo ☐ Historisch protocol	
Voorbehandeling	☐ CC1 voor …. min ☐ Protease 1 voor ….. min ☐ Protease 3 voor ….. min
Incubatie antilichaam	☐ RTU ☐ Verdunning: ….. ….. min
Detectiesysteem	☐ Amplifier: ☐ Mouse voor ….. min ☐ Rabbit voor ….. min ☐ Ultrawash ☐ Ultrablock: option 1 voor ….. min

Evaluatie uitgangsprotocol		
Nr. coupe	Datum + initialen uitvoerder	Evaluatiecriteria

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

		• Specifieke kleuring: ja / nee ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++) • Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee

sciensano

.be

Validatiedossier
Optimalisatietesten

1ste optimalisatie van het kleurprotocol		
Aanpassing		
Nr. coupe	Datum + initialen uitvoerder	Evaluatiecriteria

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

Conclusie		
☐ De resultaten van de kleuring zijn in overeenstemming met de verwachtingen en het gebruikte protocol kan gebruikt worden voor verdere validatie ☐ De kleuring moet verder geoptimaliseerd worden Suggestie van aanpassing: ☐ Het antilichaam voldoet niet en wordt niet in gebruik genomen.		
Datum + initialen patholoog:		

2de optimalisatie van het kleurprotocol		
Aanpassing:		
Nr. coupe	Datum + initialen uitvoerder	Evaluatiecriteria

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

		• Specifieke kleuring: ja / nee
		  ○ Aanvaardbaar, te zwak (-, --, ---), te sterk (+, ++, +++)
		• Aspecifieke of specifieke achtergrondkleuring: ja / nee
		  ○ Achtergrond gelinkt aan primair AB, secuncair AB (detectie), endogene peroxidase activiteit, biotine, …
		• Tegenkleuring: ja / nee

Conclusie		
☐ De resultaten van de kleuring zijn in overeenstemming met de verwachtingen en het gebruikte protocol kan gebruikt worden voor verdere validatie ☐ De kleuring moet verder geoptimaliseerd worden Suggestie van aanpassing: ☐ Het antilichaam voldoet niet en wordt niet in gebruik genomen.		
Datum + initialen patholoog:		

Validatiedossier
Optimalisatietesten

Weefsel testcoupe: 07B 03434-3 HHV8 geïnfecteerd weefsel

Gegevens kleuring:

- Toestel:O
- MLT: WW

Beoordeeld door: WB

Datum beoordeling: 29/03/2016

Datum	Run	Voorbehandeling	Verdunning	S-A-M	Eindbeoordeling
25/03/16	10953	20'ER2	1/50	3-3-3	optimaal
25/03/16	10953	20'ER2	1/100	3-3-3	optimaal
25/03/16	10953	30'ER1	1/150	2-3-3	goed
25/03/16	10953	30'ER2	1/150	3-3-3	optimaal

Besluit: bij verdunning 1/150 geeft 30'ER2 een zeer goed resultaat. Deze combinatie gebruiken?

sciensano

.be

Validatiedossier
Validatieplan

Toestel/reagentia → Performantie-karakteristieken → Acceptatiecriteria

Toepassings-gebied

Matrix

Soort en aantal te testen stalen

Validatieteam

Tijdsbestek

Implementatie

sciensano

.be

Validatiedossier
Doel en toepassingsgebied

Doel van de validatie

- de analyse / methode is reeds lang in gebruik – in dit rapport zitten zowel resultaten van validatietesten van vroeger, gegevensanalyse van vroegere resultaten als nieuwe validatietesten verwerkt
- overgang naar een nieuwe analyse / methode (test / methode werd vroeger volgens een ander protocol in het CMGG uitgevoerd)
- volledig nieuwe analyse / methode

Toepassingsgebied van de onderzoeksmethode

Het *HER2* gen bevindt zich op chromosoom 17 en codeert voor het HER2 proteïne. Dit proteïne is een transmembraanreceptor tyrosine kinase dat overeenkomsten vertoont met de 'epidermal growt factor receptor' (EGFR of HER1). In normale diploïde cellen zijn er 2 kopijen van het *HER2* gen aanwezig.
In ongeveer 18% van de borstkankerpatiënten is er, ten gevolge van het proces tot een kwaadaardige cel en tumorgroei, een amplificatie van het *HER2* gen (Slamon *et al.*, 1987). Deze amplificatie leidt in het algemeen tot een overexpressie van het HER2 proteïne aan de celoppervlakte van de cellen van het borstcarcinoom. Dit gaat gepaard met een slechtere prognose, een verhoogd risico van herval en een verlaagde overlevingskans. Klinische studies hebben aangetoond dat de HER2 status gecorreleerd is met de gevoeligheid/resistentie tegen bepaalde chemotherapieën. Patiënten met een amplificatie van HER2 reageren zeer goed op een behandeling met Herceptin™, waardoor het essentieel is deze amplificatie in kaart te brengen.

Validatiedossier
Toestel/reagentia

Lotnummers gebruikte producten:

Her2 (4B5) : E06148
Ultraview DAB kit: Inhibitor: D10569
HRP multimer: D10568
Chromogeen: D10570
H_2O_2: D10571
Copper: D10572
Hematoxylin 2: D10597
Bluing reagent: D10797

Toestellen:

Ultra 1: serienummer K4311222
Ultra 2: serienummer K4311196

sciensano

.be

Valiatiedossier
Performantiekarakteristieken en wijze

Accuraatheid / correctheid van de test:

- Aantonen dat de werkwijze voor het uitvoeren van de bestaande immuunhistochemische test voor Her2 én de interpretatie ervan op de dienst Pathologische Ontleedkunde van het [redacted] vergelijkbare resultaten oplevert als een andere gevalideerde Her2 test in een ander labo.
- 25 borstcarcinomen met verschillende immuunhistochemische scores (0, 1+, 2+ en 3+) zullen retrospectief worden beoordeeld door eenzelfde patholoog en worden vergeleken met het resultaat van de gevalideerde en geaccrediteerde FISH Her2 test te [redacted]
- Het doel is om een concordantie te bekomen van 95% tussen IHC score 0 en FISH Her2 resultaat en 95% tussen IHC score 3+ en FISH Her2 resultaat.
- Bovendien zal accuraatheid bepaald worden op basis van vroegere resultaten van externe kwaliteitscontrole via NordiQC.

Interrun reproduceerbaarheid van de test:

- Validatie van variatie in personeel, toestellen en tijdstip van uitvoering
- Personeel: 3 MLT's van jonge, middelbare en oudere leeftijd
- Toestellen: 3 verschillende microtomen en 3 verschillende Benchmarks
- Tijdstip: 3 verschillende dagen
- 10 gevallen zullen worden getest met het bestaande IHC Her2 protocol in 3 verschillende runs
- Het doel is om een concordantie te bekomen van 95% tussen de verschillende variabelen.

Herhaalbaarheid van de test:

- Bepalen van precisie in eenzelfde run ('intrarun reproduceerbaarheid')
- Aan de hand van eenzelfde controleblok per run (score 0, 1+, 2+ en 3+) op elk glaasje van de 3 bovenstaande runs zal de herhaalbaarheid binnen elke run getest worden.
- Het doel is om een concordantie te bekomen van 95% tussen dezelfde externe controles op de verschillende glaasjes.

Wat

Hoe

Criterium

.be

Validatiedossier
Matrix en keuze stalen

Fixatief: 10% gebufferde formaline
Fixatieduur: minimum 6 uur en maximum 48 uur (ook meer dan 48 uur voor validatie van variatie in fixatietijd)
Specimentypes: paraffine ingebed weefsel van resectiespecimens (mastectomie of brede excisie of metastase) en core needle biopsies van borstkankers

GESCHIKTE STALEN/CONTROLEBLOKKEN					
	Weefseltype	Staalnummer	Blok	Resultaat intern	Resultaat extern
1	Borst	HER 1.3	/	Heterogeen, + en -	
2	Borst Core naald biposie (CNB)	16H09405	1-1	2+	
3	Borst resectie (R)	16H00303	1-11	0	
4	Borst Core naald biposie (CNB)	16H06828	1-1	2+	
5	Borst resectie (R)	15H14044	1-3	3+	
6	Borst Core naald biposie (CNB)	15H16175	1-1	3+	
7	Borst Core naald biposie (CNB)	15H17422	1-1	3+	
8	Borst Core naald biposie (CNB)	15H17384	1-1	1+	

sciensano

.be

Validatiedossier
Acceptatiecriteria

De variatie dient aardbaar' te worden ingeschat.

Criterium	Beoogd resultaat
Evaluatie geprogrammeerde stappen	Kleurprotocol correct uitgevoerd binnen de vooropgestelde kwaliteit van kleuring
Kleurkwaliteit - accuraatheid	Resultaten accuraat (evenwaardig aan referentietechniek)
Kleurkwaliteit - precisie	Correlatie within en between run >95%
Kleurkwaliteit - gevoeligheid	>90 % (diagnostisch positieve vs vals negatieve)
Kleurkwaliteit - specificiteit	Specificiteit >95% (diagnostisch negatieve vs vals positieve)
Interpretatie kleurresultaten	Correlatie met resultaten referentietechniek >90% (CAP 2013-2014)
Interpersoonlijke toetsing	Correlatie tussen beoordelende pathologen >90%

sciensar

.be

Validatiedossier
Resultaten en tussentijdse conclusies

3.3 Reproduceerbaarheid

Uitvoering: 3 coupes van een gecombineerde testblok TB-HER2 worden gekleurd voor HER2 in 3 verschillende runs.

Criterium voor geslaagde test: het immuunhistochemisch resultaat in de 3 coupes is identiek.

Beoordeeld door: CC op: 11/05/2015

Datum IHC	Code testblok	HER2 IHC score core 1	HER2 IHC score core 2	HER2 IHC score core 3
28/04/2015	TB-HER2 162	3+	2+	0
06/05/2015	TB-HER2 162	3+	2+ (losgekomen en verfrommeld waardoor moeilijk beoordeelbaar)	0
07/05/2015	TB-HER2 162	3+	2+	0
08/05/2015	TB-HER2 162	3+	2+	0

Besluit: geslaagde reproduceerbaarheidstest.

EERDE KOPIE

Validatiedossier
Resultaten en tussentijdse conclusies

VALIDATIE VAN HET ANTILICHAAM		
Kleuring/Antilichaam	Her2 Neu	
Datum en Uitvoerder kleuring	15/06/2016 en 22/06/2016 PD PD	
Nummer	**Verwachte resultaat**	**Bekomen resultaat + eventuele opmerkingen**
HER 1.3	Score 0, 1+, 2+, +-3+	Score 0, 1+, 2+, +-3+
HER 1.3 HER 1.5	Score 0, 1+, 2+, +-3+ Score 0, 1+, 2+, +-3+	Score 0, 1+, 2+, +-3+ Score 0, 1+, 2+, +-3+
16H09405 1-1	Score 2+	Score 2+
16H00303 1-1	Score 0	Score 0
16H06828 1-1	Score 2+	Score 2+
15H14044 1-3	Score 3+	Score 3+
15H16175 1-1	Score 3+	Score 3+
15H17422 1-1	Score 3+	Score 3+
15H17384 1-1	Score 1+	Score 1+
	Nota: op elke glaasje een controblok gelegd HER 1.3: zelfde aankleuring op elk glaasje	
	Rondje 1	**0-1 +**
	Rondje 2	**1+**
	Rondje 3	**2+**
	Rondje 4	**3+**

sciensan

.be

Validatiedossier
Continue validatie

6. Resultaten continue validatie

6.1 Resultaten jaar 2016

6.1.1 Deelname aan externe kwaliteitsronde en tuning

Uitvoering: In januari 2016 werd er deelgenomen aan Run B21 van NordiQC voor externe kwaliteitscontrole van HER2 IHC. We ontvingen van NordiQC twee glaasjes met hierop telkens 5 cores van borstcarcinoomweefsels. De coupes werden initieel beoordeeld door ML. Na ontvangst van de resultaten van NordiQC werd de coupe beoordeeld door alle pathologen-anatomen.

Criterium voor geslaagde test: goede beoordeling door NordiQC (geen verschillen van meer dan één HER2 IHC scorecategorie en alle carcinomen met genamplificatie krijgen minstens een score 2+). Geen verschillen van meer dan één HER2 IHC scorecategorie tussen de pathologen-anatomen onderling.

Resultaten:

De resultaten werden ontvangen op 21/04/2016.

Resultaat beoordeling kwaliteit door NordiQC: 'optimaal'

Score consensus: 'yes'

Resultaten EKE

Core	HER2 IHC*	HER2/Chr17*	ML	GG	CC	PV	MCT	GVDE	RS	MH
1	3+	>6.0	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
2	2+	2.4-2.9	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
3	1-2+	1.2-1.7	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
4	0-1+	1.1-1.4	1+	0+	0	0	0	0	0	0
5	0-1+	0.9-1.2	0	0	0	0	0	0	0	0

*NordiQC referentie

Resultaten tuning

Conclusie:

De derdelijnscontrole en de tuning is geslaagd.

EERDE KOPIE

Validatiedossier
Continue validatie

6.3 Correlatie NEU IHC - HER2 SISH

6.3.1 Jaaroverzichten

Van elk kalenderjaar worden statistieken geïncludeerd in het validatierapport (borsttumoren). Op basis hiervan kunnen veranderingen/afwijkingen van oa. het aantal stalen, positiviteitsratio en concordantie met immunohistochemie opgevolgd worden.
Uit de literatuur blijkt een reële positiviteitsratio: 18-23% (Owens et al. 2004; Jaziji et al. 2004).

6.3.5 04/2015 - 04/2016

IHC

SISH

	0 (35.4%)	1+ (27.3%)	2+ (25.4%)	3+ (11.9%)
N (71.7%)	123 (93.8%)	87 (86.1%)	71 (75.5%)	3 (6.8%)
A (18.6%)	4 (3.1%)	8 (7.9%)	17 (18.1%)	41 (93.2%)
E (4.4%)	4 (3.1%)	6 (6%)	6 (6.4%)	0

N= non- amplified, A = amplified, E = equivocal

Besluit:

In de periode 04/2015 - 04/2016 werden 370 klinische stalen geanalyseerd en gerapporteerd. 18.6 Procent van de stalen is geamplificeerd waarvan 3% met IHC 0. 93 Procent van de IHC 3+ stalen zijn HER2 geamplificeerd.

Validatiedossier
Continue validatie

Populatiestudie

10.1.4.4. IHC Her2 labo Pathologische Ontleedkunde 2015

152 primaire gevallen met score 0-1+ / 260 nieuwe borstkankers = 58.5% score 0-1+

64 primaire gevallen met score 2+ / 260 nieuwe borstkankers = 24.6% score 2+

39 primaire gevallen met score 3+ / 260 nieuwe borstkankers = 15% score 3+

Besluit:

- Op basis van IHC Her2 bedraagt het totale jaarlijks percentage van aantal nieuwe Her2 positieve borstkankers 15%. Op basis van SISH Her2 bedraagt het percentage 15.8%. Her2 positiviteit ligt dus in de range tussen 10 en 25% zoals vooropgesteld in diagnosemethodes *IHC Her2 borst PO-DM4-0002* en *SISH Her2 borst PO-DM4-0001*.
- 24.6% van de borstkankers van 2015 werden geïnterpreteerd als IHC Her2 score 2+. Dit percentage ligt binnen de range van 18,7%±14.0%, berekend voor 36 referentieinstituten zoals gepubliceerd in Virchows Arch (2011) 459:283-289 door Choritz et al.

sciensano

.be

Conclusie

- Validatieprocedure

  validatietesten uitvoeren volgens een vastgelegde, geharmoniseerde en efficiënte manier

- Validatierapport

  registratie van alle gegevens die de testresultaten kunnen beïnvloeden

  - Sjabloon: harmonisatie

Verzekeren van efficiënte en gestandardiseerde validatie van onderzoeksmethoden

Traceerbaar bewijs voor clinici en patiënten accuraatheid van gebruikte onderzoeksmethoden voor diagnosestelling

sciensano

.be