

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

**COMMISSIE VOOR PATHOLOGISCHE ANATOMIE
WERKGROEP EKE**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE
VOOR ANALYSES PATHOLOGISCHE ANATOMIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT
IMMUNOHISTOCHEMIE – HER2/PR
ENQUETE 2023/3**

Sciensano/Immunohistochemie/19-NL

Biologische gezondheidsrisico's
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
		e-mail:	ql_secretariat@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Enquêtecoördinator	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	Vanessa.Ghislain@sciensano.be		
Leden werkgroep EKE	Instelling				
Gabriela Beniuga	IPG Gosselies				
Cecile Colpaert	ZNK Turnhout				
Bart De Wiest	OLV Aalst				
Caroline Fervaille	CHU UCL Namur				
Bart Lelie	AZ-ZENO Knokke-Heist				
Herwig Van Dijck	UZ Antwerpen				

Een draft versie van dit rapport werd voorgelegd aan de leden van de werkgroep EKE op: 20/12/2023.

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

Autorisatie van het rapport : door Vanessa Ghislain, enquêtecoördinator

Publicatiedatum : 10/01/2024

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:
<https://www.sciensano.be/nl/kwaliteit-van-laboratoria/eke-immunohistochemie>

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 methoden	7
3.3. Overzicht van de resultaten	7
3.4. Resultaten per antilichaam	8
3.4.1. HER2.....	8
3.4.2. PR	8
3.5. Resultaten van de HER2 interpretatie.....	8
3.5.1. Score biopt 1	8
3.5.2. Score biopt 2	9
3.5.3. Score biopt 3	9
3.5.4. Score biopt 4	10
3.5.5. Score biopt 5	10
3.5.6. Guidelines gevolgd voor de interpretatie van de resultaten.....	11
4. Bespreking van de resultaten	11
4.1. HER2	11
4.2. PR.....	12
4.3. HER2 interpretatie	12
5. Beelden	13

1. Inleiding

Dit document bestaat uit een overzicht en een bespreking van de resultaten van de externe kwaliteitsevaluatie (EKE) Immunohistochemie 2023/3 (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.


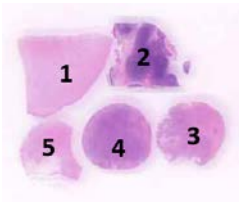
1.2. UITBESTEDE ACTIVITEITEN

Het weefselmateriaal is afkomstig van het laboratorium pathologische ontleedkunde van het OLV ziekenhuis te Aalst.

1.3. MATERIAAL VAN DE EKE

Het opgestuurde materiaal bestond uit 2 ongekleurde paraffinecoupes met punchbiopten afkomstig van operatiestukken. 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).

De multiblokken werden vrijgegeven door de werkgroep EKE op 31/08/2023. De evaluatie van de HER2 multiblok gebeurde aan de hand van IHC kleuringen met de antilichamen van Ventana/Roche (kloon 4B5) en Dako/Agilent (polyclonaal antilichaam) en een in situ hybridisatie (SISH). De coupes werden bijkomend gekleurd door NordiQC (Pathway van Roche en HercepTest van Agilent).

HER2		PR	
1. Borstcarcinoom		1. Normale cervix	
2. Borstcarcinoom		2. Normale tonsil	
3. Borstcarcinoom		3. Borstcarcinoom	
4. Borstcarcinoom		4. Borstcarcinoom	
5. Borstcarcinoom		5. Borstcarcinoom	

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 controlecoupe 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.

Er werd ook gevraagd om de HER2 score voor elk van de biopten te registreren. Voor PR werd geen interpretatie gevraagd.

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 2 anatoom-pathologen en door de enquêtecöördinator, Vanessa Ghislain (Sciensano). De evaluatie vond plaats op 22 november 2023 in het UZ Gent. Voor bijkomende anonimatisatie 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). De scores gerapporteerd voor de interpretatie van de HER2 biopten werden geëvalueerd maar telden niet mee voor het eindresultaat.


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 aspecifieke achtergrond genereren;
- **de morfologie** : de kleuring mag de morfologie zo weinig mogelijk wijzigen.

2.2. SPECIFIEKE CRITERIA PER EPITOOP

2.2.1. HER2

Biopten		IHC*	ISH* (ratio)
1. Borstcarcinoom		1) 3+	1) Amplified (3.98)
2. Borstcarcinoom		2) 0	2) Not amplified (-)
3. Borstcarcinoom		3) 1-2+	3) Not amplified (1.18)
4. Borstcarcinoom		4) 1-2+	4) Not amplified (1.08)
5. Borstcarcinoom		5) 2+	5) Amplified (4.60)

(*) Kleuringen uitgevoerd cfr. punt 1.3; scoring volgens de 2018 ASCO/CAP guidelines.

Beoordeling controleweefsel van het laboratorium :

Controleweefsel aanwezig?	Conform de richtlijnen*?	Richtlijnen*
Ja / Neen	Conform / Niet conform	Er dient minstens een sterk positieve (3+) en een negatieve (1+ en/of 0) controle als dagelijks controlemateriaal te worden gebruikt. Zwak positieve (2+) controles zijn sterk aanbevolen.

- (*)
- Praktijkrichtlijn voor de erkende laboratoria voor pathologische anatomie, versie 2.2, 09/10/2023
 - 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

- 1) **Cervix** : matig tot sterke nucleaire aankleuring van bijna alle columnaire epitheelcellen (indien aanwezig) en van de meeste stromale cellen (uitgezonderd endotheliale en lymfoïde cellen); minstens zwakke nucleaire aankleuring van de basale squameuze epitheelcellen
- 2) **Tonsil** : geen nucleaire aankleuring
- 3) **Borstcarcinoom** : minstens matige nucleaire aankleuring in 30% (of minstens 10%) van de tumorale cellen
- 4) **Borstcarcinoom** : matig tot sterke nucleaire aankleuring in 100% van de tumorale cellen
- 5) **Borstcarcinoom** : geen (of minder dan 1%) nucleaire aankleuring in de tumorale cellen

2.3. EINDBEOORDELING

2.3.1. HER2

- **Optimaal** : de kleuring van biopt 5 komt overeen met een score 2+; de kleuring van biopt 3 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 de kleuring van biopt 1 komt overeen met een score 2+ of algemeen weinig intense membranaire aankleuring of te zwakke tegenkleuring
- **Borderline** : er is cytoplasmatische aankleuring die interfereert met de interpretatie van de membranaire aankleuring; optimalisatie van het protocol is nodig
- **Onvoldoende** : de kleuring van biopt 1 of biopt 5 komt overeen met een score 0 of 1+; 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 (bv. $\geq 10\%$ positiviteit in biopt 4 maar te lage proportie of te weinig intense aankleuring t.o.v. de referentiecoupe) of de basale laag van het squameuze cervixepitheel is vals negatief 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 één van de borstbiopten (bv. $\geq 1\%$ en $< 10\%$ positiviteit in biopt 3 of 4) 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 (d. w.z. $< 1\%$ positiviteit in biopt 3 of 4 of $\geq 1\%$ positiviteit in biopt 5); optimalisatie van het protocol is dringend nodig

3. Resultaten

3.1. DEELNAME AAN DE EKE

Het deelnamepercentage bedroeg 59/61 (97%).

Gewest	Aantal laboratoria dat stalen ontving (ingeschrevenen)	Aantal laboratoria dat een HER2 coupe terugstuurde	Aantal laboratoria dat een PR coupe terugstuurde
Vlaams gewest	37	35	37
Brussels gewest	8	8	8
Waals gewest	15	13	13
Farm. firma's	1	1	1
Totaal	61	57	59

3.2. OVERZICHT VAN DE METHODEN

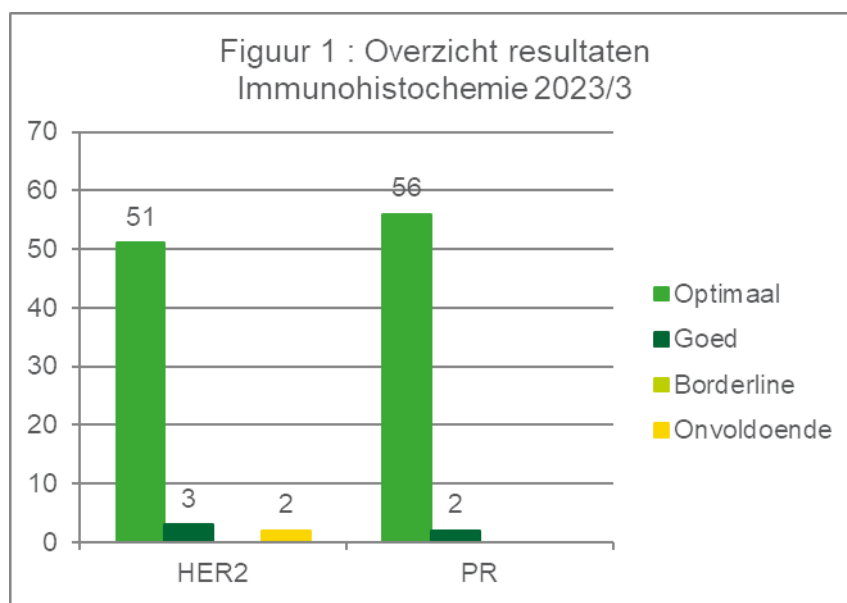
De kleuringen werden door alle laboratoria uitgevoerd d.m.v. een automaat en op hetzelfde type automaat voor beide parameters :

Antwoorden	N
Ventana Ultra	34
Dako Omnis	18
Dako Autostainer	3
Leica Bond III	2
Totaal (laboratoria die de HER en PR kleuring hebben uitgevoerd)	57

3.3. 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	51 (91%)	56 (97%)
Goed	3 (5%)	2 (3%)
Borderline	0	0
Onvoldoende	2 (4%)	0
Totaal	56	58



3.4. RESULTATEN PER ANTILICHAAM

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

3.4.1. HER2

HER2							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 16)							
Polyclonaal	16	Dako/Agilent Technologies	14	1	0	1	94%
Ready-To-Use antilichamen (n = 40)							
rm 4B5	32	Cell Marque/Ventana/Roche	29	2	0	1	97%
rm DG44 (HercepTest)	7	Dako/Agilent Technologies	7	0	0	0	100%
mm CB11	1	Leica / Novocastra	1	0	0	0	1/1

(*) optimaal/goed

mm = mouse monoonaal antilichaam

rm = rabbit monoonaal antilichaam

3.4.2. PR

PR							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 4)							
mm PgR 1294	2	Dako/Agilent Technologies	2	0	0	0	2/2
mm 16	1	Leica/Novocastra	1	0	0	0	1/1
mm 16 + SAN27	1	Leica/Novocastra	1	0	0	0	1/1
Ready-To-Use antilichamen (n = 54)							
rm 1E2	32	Cell Marque/Ventana/Roche	32	0	0	0	100%
mm PgR 1294	17	Dako/Agilent Technologies	15	2	0	0	100%
mm PgR 636	3	Dako/Agilent Technologies	3	0	0	0	100%
mm 16	2	Leica/Novocastra	2	0	0	0	2/2

(*) optimaal/goed

mm = mouse monoonaal antilichaam

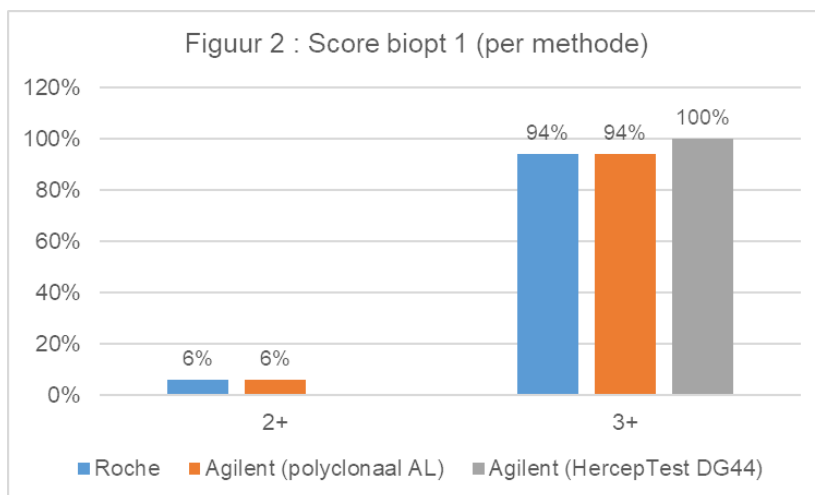
rm = rabbit monoonaal antilichaam

3.5. RESULTATEN VAN DE HER2 INTERPRETATIE

3.5.1. Score biopt 1

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 3+**.

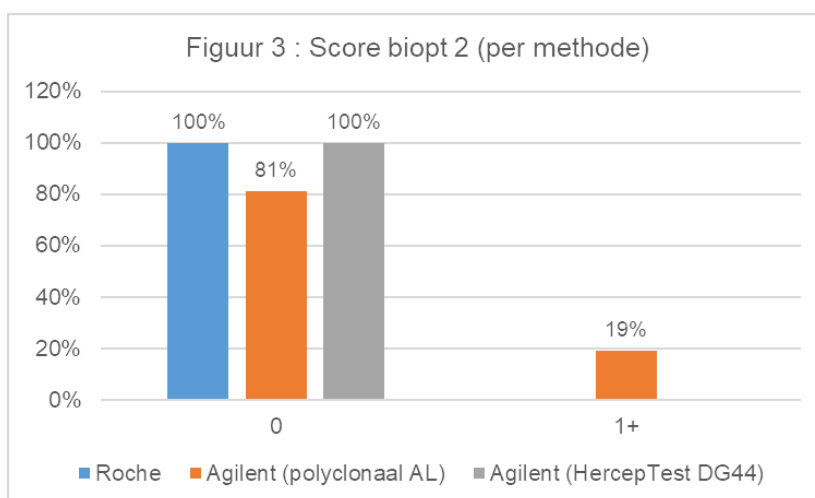
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	0	0	0
1+	0	0	0
2+	2	1	0
3+	30	22	1



3.5.2. Score biopt 2

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 0**.

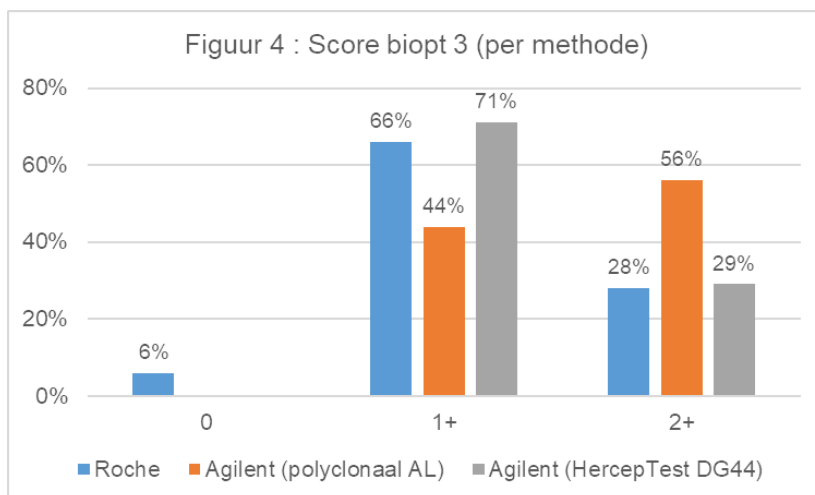
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	32	20	1
1+	0	3	0
2+	0	0	0
3+	0	0	0



3.5.3. Score biopt 3

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 1-2+**.

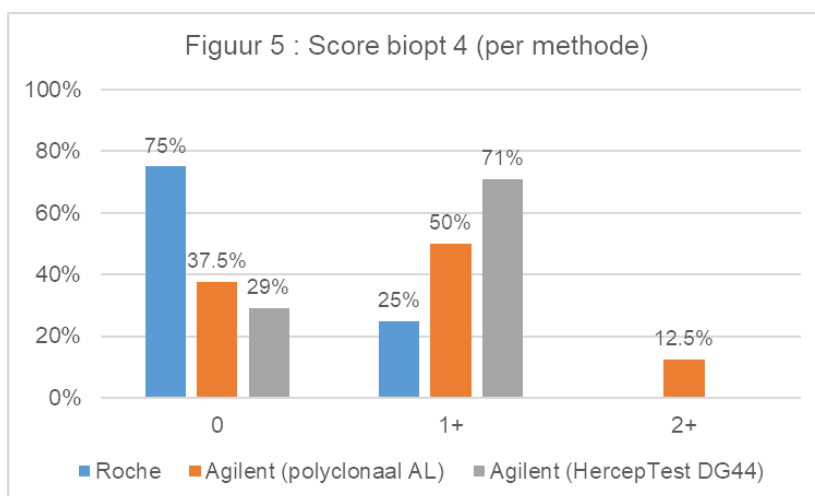
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	2	0	0
1+	21	12	1
2+	9	11	0
3+	0	0	0



3.5.4. Score biopt 4

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 1-2+**.

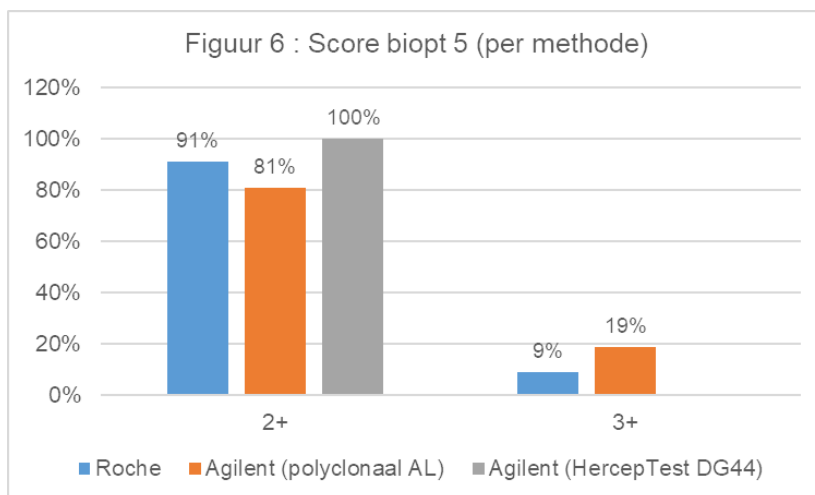
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	24	8	1
1+	8	13	0
2+	0	2	0
3+	0	0	0



3.5.5. Score biopt 5

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 2+**.

Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	0	0	0
1+	0	0	0
2+	29	20	1
3+	3	3	0



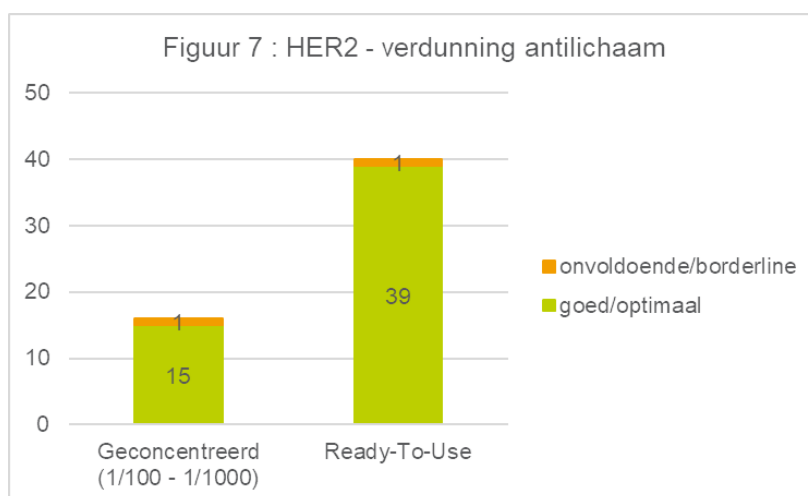
3.5.6. Guidelines gevolgd voor de interpretatie van de resultaten

Antwoorden	N
ASCO/CAP Guidelines 2018	47
ASCO/CAP Guidelines 2018 – Belgian guidelines 2014	1
Belgian Guidelines 2014	7
British	1

4. Bespreking van de resultaten

4.1. HER2

- De HER2 kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 54/56 deelnemers (96%) (zie figuur 1).
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 55/56 deelnemers (98%). De controlecoupe was conform in 49/55 (89%) gevallen.
- De meest gebruikte antilichamen zijn kloon 4B5 (32/56 laboratoria of 57%) en het polyclonaal antilichaam A0485 (16/56 laboratoria of 29%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd in 16/56 laboratoria (29%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam in 40/56 laboratoria (71%) (zie figuur 7).



- 2 Laboratoria behaalden een onvoldoende resultaat omdat de kleuring van biopt 5 (2+/A) overeenkwam met een score 1+.

- 2 Laboratoria behaalden een resultaat 'goed' omdat de kleuring van biopt 1 (3+/A) overeenkwam met een score 2+

4.2. PR

- De PR kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 58/58 deelnemers (100%) (zie figuur 1).
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 43/58 deelnemers (74%).
- De meest gebruikte klonen zijn 1E2 (32/58 laboratoria of 55%) en PgR 1294 (23/58 laboratoria of 40%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd in 4/58 laboratoria (7%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam in 54/58 laboratoria (93%).
- 2 Laboratoria behaalden een resultaat 'goed' wegens vals negatieve aankleuring van de basale laag van het squameuze cervixepitheel.
- 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 squameus epitheel van de cervix is biologisch mogelijk, bv. bij postmenopauzale vrouwen. Bijgevolg is de juiste selectie van een cervix staal dat bovenstaand expressiepatroon toont vereist.** Endotheliale en lymfoïde cellen van de cervix mogen niet aankleuren. Tonsil kan gebruikt worden als negatieve controle : er mag geen nucleaire aankleuring aanwezig zijn.

4.3. HER2 INTERPRETATIE

- De consensus interpretatie van de deelnemers kwam overeen met het verwachte resultaat (in vet in de tabel hieronder) voor de biopten 1, 2 en 5, maar niet voor de biopten 3 en 4 :

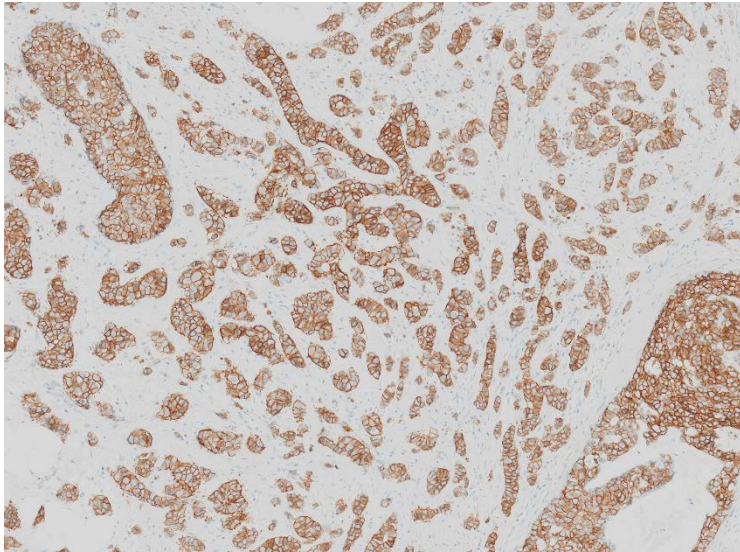
Antwoorden	Biopt 1	Biopt 2	Biopt 3	Biopt 4	Biopt 5
Verwacht resultaat	3+/A*	0/NA*	1-2+/NA	1-2+/NA	2+/A
0	-	95%	3%	59%	-
1+	-	5%	61%	37.5%	-
2+	5%	-	36%	3.5%	89%
3+	95%	-	-	-	11%

(*) A = amplified, NA = not amplified

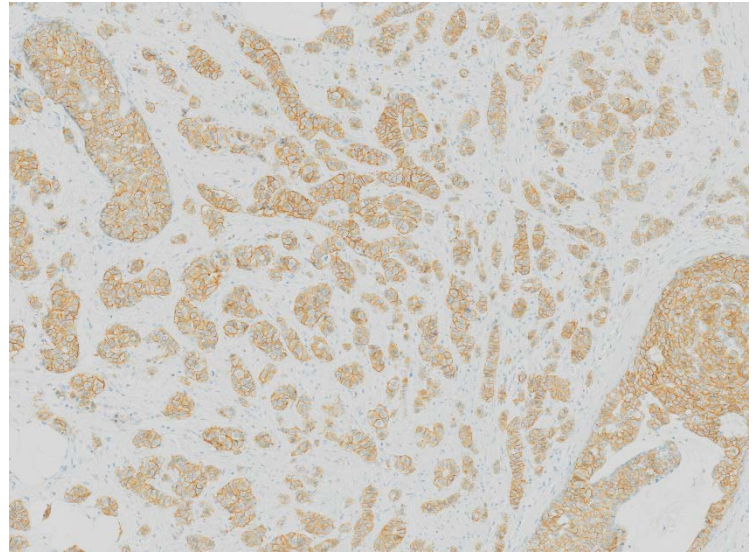
- Het gebrek aan consensus voor biopten 3 en 4 houdt verband met de gebruikte methode (zie ook figuren 4 en 5). Meer bepaald is er voor biopt 3 geen consensus tussen de resultaten bekomen met éénzelfde leverancier en/of antilichaam; voor biopt 4 is er geen consensus tussen de 2 leveranciers.
- In deze EKE zijn de IHC en ISH resultaten voor elk biopt concordant en hebben we geen overinterpretatie van de IHC vastgesteld. Dit wil zeggen dat de 3 niet geamplificeerde biopten van deze EKE door geen enkel laboratorium als 3+ werden gekleurd en/of geïnterpreteerd. Het is momenteel echter nog verplicht om een bevestiging via ISH uit te voeren voor biopten gescoord als 3+. Als de ISH bevestiging op 3+ biopten wordt afgeschaft, worden deze onmiddellijk beschouwd als HER2 positief en dreigt het gevaar van overinterpretatie van de tumor en een onnodige behandeling van de patiënt.

5. Beelden

HER2

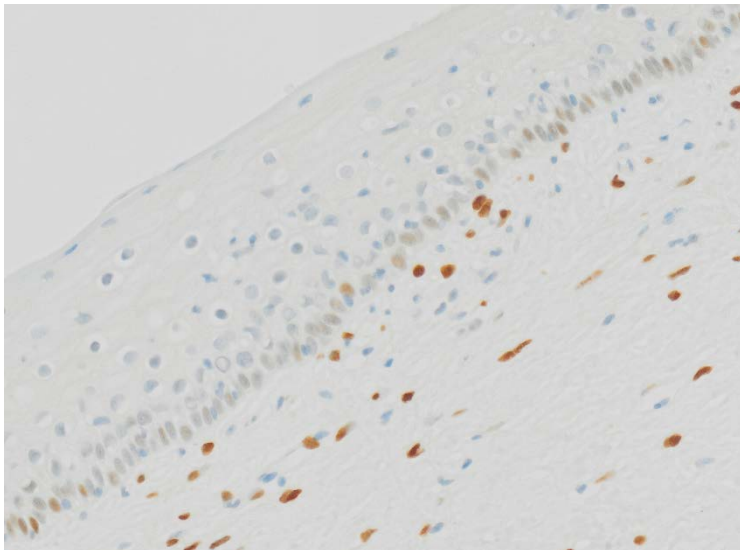


Biopt 1 (3+/amplified) – optimaal : optimale kleuring; sterke, complete membraanre aankleuring in >10% van de tumorale cellen, waarneembaar op lage vergroting

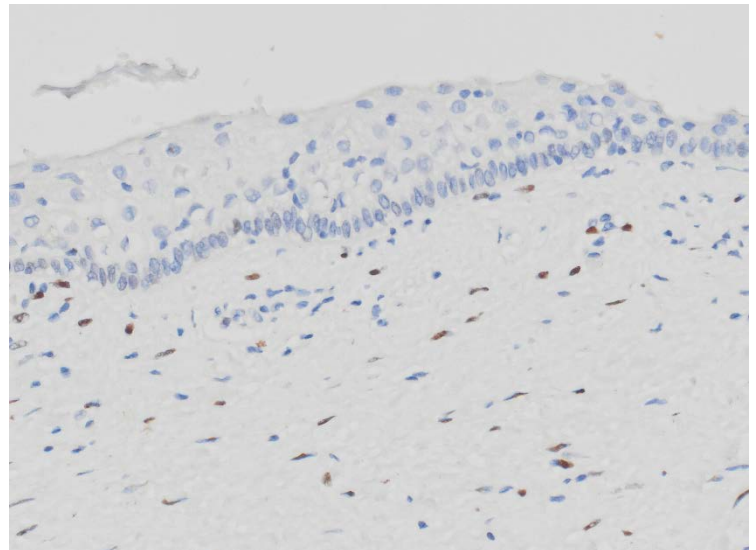


Biopt 1 (3+/amplified) – goed : de kleuring komt technisch gezien overeen met een score 2+ (de membraankleuring is te weinig intens), maar werd door het laboratorium geïnterpreteerd als score 3+

PR



Cervix – optimaal : lage expressor; minstens zwakke nucleaire aankleuring van de basale squameuze epitheelcellen



Cervix – goed : vals negatieve aankleuring van de basale squameuze epitheelcellen

EINDE

© Sciensano, Brussel 2024.

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.