

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

**COMMISSIE VOOR PATHOLOGISCHE ANATOMIE
WERKGROEP EKE**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE
VOOR ANALYSES PATHOLOGISCHE ANATOMIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT
IMMUNOHISTOCHEMIE – HER2/ER
ENQUETE 2022/1**

Sciensano/Immunohistochemie/14-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
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				

Een voorlopige versie (draft) van dit rapport werd voorgelegd aan de leden van de werkgroep EKE op: 11/05/2022.

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

Autorisatie van het rapport : door Vanessa Ghislain, enquêtecoördinator

Publicatiedatum : 19/05/2022

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:
https://www.wiv-isp.be/QML/Anapath/external_quality/rapports/_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.....	5
2. Beoordeling	5
2.1. Algemene criteria.....	5
2.2. Specifieke criteria per epitoom.....	5
2.2.1. HER2.....	5
2.2.2. ER	6
2.3. Eindbeoordeling.....	6
2.3.1. HER2.....	6
2.3.2. ER	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. ER	8
3.4. Resultaten van de HER2 interpretatie.....	8
3.4.1. Score biopt 1	8
3.4.2. Score biopt 2	9
3.4.3. Score biopt 3	9
3.4.4. Score biopt 4	10
3.4.5. Score biopt 5	10
3.4.6. Guidelines gevolgd voor de interpretatie van de resultaten.....	11
4. Bespreking van de resultaten	11
4.1. HER2	11
4.2. ER.....	11
4.3. HER2 interpretatie	12
5. Beelden	14

1. Inleiding

Dit document bestaat uit een overzicht en een bespreking van de resultaten van de externe kwaliteitsevaluatie (EKE) Immunohistochemie 2022/1 (HER2/ER) 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 ER (oestrogeen receptor) te evalueren.

1.2. UITBESTEDE ACTIVITEITEN

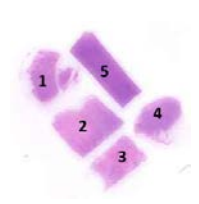
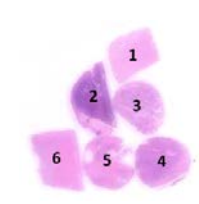
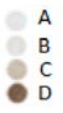
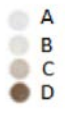
Het weefselmateriaal is afkomstig van het laboratorium pathologische ontleedkunde van het OLV ziekenhuis te Aalst.

1.3. MATERIAAL VAN DE EKE

Het opgestuurde materiaal bestond uit 2 ongekleurde paraffinecoupes met 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).

De multiblokken werden vrijgegeven door de werkgroep EKE op 09/02/2022. 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).

De subkloon van 3+ cellen in biopt 4 (zie 2.2.1) was niet aanwezig in de coupes die gebruikt werden voor vrijgave van de rondzending. **Deze subkloon was echter wel aanwezig in alle coupes van alle deelnemers.**

		HER2		ER
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) Osteosarcoom B) Urotheel carcinoom C) NSCLC D) Borst adenocarcinoom

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 elke coupe 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 ER 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 ER 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 enquêtecoördinator, Vanessa Ghislain (Sciensano). De evaluatie vond plaats op 29 maart 2022 op Sciensano. 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

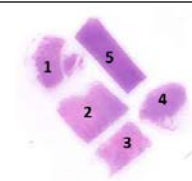
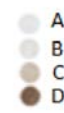
Algemeen is de beoordeling gebaseerd op :

- **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 en cellijnen :

			IHC	ISH (ratio)
Biopten*	1. Borstcarcinoom 2. Borstcarcinoom 3. Borstcarcinoom 4. Borstcarcinoom 5. Borstcarcinoom		1) 0 2) 1-2+ 3) 1-2+ 4) 2+ (focaal 3+) 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)
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

(*) 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	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. ER

Biopten :

- 1) **Cervix** : matig tot sterke nucleaire aankleuring van bijna alle columnair epitheel, basaal squameus epitheel en de meeste stromale cellen (uitgezonderd endotheliale en lymfoïde cellen)
- 2) **Tonsil** : minstens zwak tot matige nucleaire aankleuring in verspreide folliculaire dendritische cellen/T-cellen en plaveiselcel epitheel
- 3) **Borstcarcinoom** : sterke nucleaire aankleuring in 100% van de tumorale cellen
- 4) **Borstcarcinoom** : zwakke nucleaire aankleuring in 1-10% van de tumorale cellen (zwakke expressor)
- 5) **Borstcarcinoom** : matige nucleaire aankleuring in 80-90% van de tumorale cellen
- 6) **Borstcarcinoom** : geen nucleaire aankleuring in de tumorale cellen

Cellijnen :

- A) **Osteosarcoom** : negatief
- B) **Urotheel carcinoom** : zwak positief
- C) **NSCLC** : matig positief
- D) **Borstcarcinoom** : sterk positief

2.3. EINDBEOORDELING

2.3.1. HER2

- **Optimaal** : de kleuring van biopt 4 komt overeen met een score 2+ (focaal 3+); 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 1 komt overeen met een score 1+) of algemeen weinig intense membranaire aankleuring of er is cytoplasmatische aankleuring die interfereert met de interpretatie van de membranaire aankleuring of te zwakke tegenkleuring of de kleuring van subkloon 3+ in biopt 4 is correct maar de kleuring van de andere cellen in hetzelfde biopt komt niet overeen met de beoogde score 2+/amplified (te zwakke kleuring)
- **Borderline** : één van de cellijnen is vals negatief; optimalisatie van het protocol is nodig
- **Onvoldoende** : de kleuring van biopt 5 komt overeen met een score 0 of 1+; optimalisatie van het protocol is dringend nodig

2.3.2. ER

- **Optimaal** : de kleuring komt overeen met de criteria hierboven beschreven (zie 2.2.2.)
- **Goed** : algemeen matige aankleuring (bv. te zwakke aankleuring in cervix of tonsil) of onvoldoende aankleuring in de cellijnen of vals positieve aankleuring in de cellijnen of cytoplasmatische aankleuring of te zwakke tegenkleuring of zwak positieve aankleuring in biopt 6 waardoor (vals) positief kan geïnterpreteerd worden
- **Borderline** : vals positieve aankleuring in het endotheel van het cervixbiopt of cytoplasmatische aankleuring die interfereert met de interpretatie of onvoldoende aankleuring in biopten 3 of 5 (d.w.z. $\geq 1\%$ en $< 10\%$ positiviteit) of geen aankleuring in cervix of tonsil of biopt 4 (zwakke expressor); optimalisatie van het protocol is nodig
- **Onvoldoende** : vals negatieve of vals positieve aankleuring in één van de borstbiopten (d.w.z. $< 1\%$ positiviteit in biopten 3 en 5 of $\geq 1\%$ positiviteit in biopt 6 of $> 10\%$ positiviteit in biopt 4) of constante overkleuring; optimalisatie van het protocol is dringend nodig

3. Resultaten

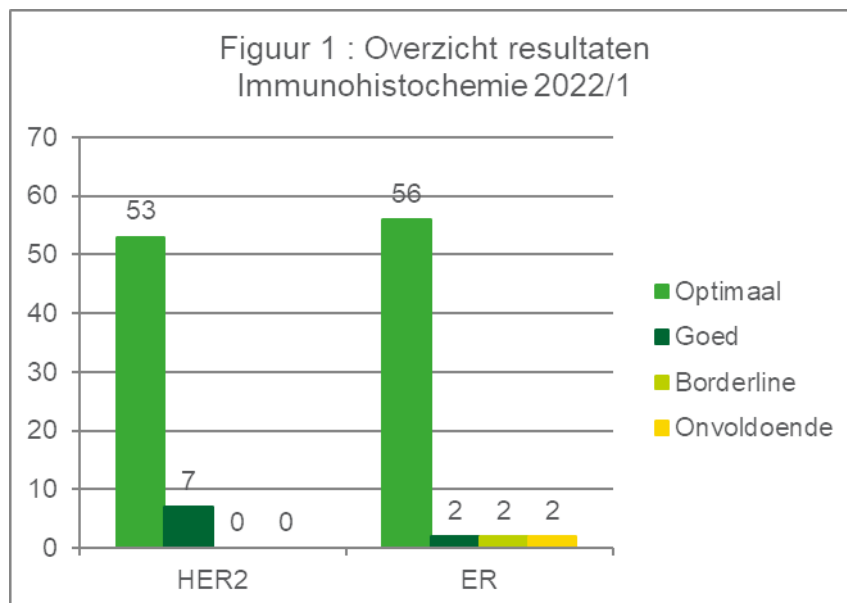
3.1. DEELNAME AAN DE EKE

Het deelnamepercentage bedroeg 62/64 (97%).

Gewest	Aantal laboratoria dat stalen ontving (ingeschrevenen)	Aantal laboratoria dat een HER2 coupe terugstuurde	Aantal laboratoria dat een ER coupe terugstuurde
Vlaams gewest	40	37	39
Brussels gewest	9	8	8
Waals gewest	15	15	15
Farm. firma's	0	0	0
Totaal	64	60	62

3.2. OVERZICHT VAN DE RESULTATEN

Eindresultaat	HER2	ER
Optimaal	53 (88%)	56 (90%)
Goed	7 (12%)	2 (3%)
Borderline	0	2 (3%)
Onvoldoende	0	2 (3%)
Totaal	60	62



3.3. RESULTATEN PER ANTILICHAAM

3.3.1. HER2

HER2							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 19)							
Polyclonaal	18	Dako/Agilent Technologies	13	5	0	0	100%
rm SP3	1	Cell Marque/Ventana/Roche	1	0	0	0	1/1
Ready-To-Use antilichamen (n = 41)							
rm 4B5	34	Cell Marque/Ventana/Roche	32	2	0	0	100%
rm DG44 (HercepTest)	6	Dako/Agilent Technologies	6	0	0	0	100%
mm CB11	1	Leica / Novocastra	1	0	0	0	1/1

(*) optimaal/goed

mm = mouse monoclonaal antilichaam

rm = rabbit monoclonaal antilichaam

3.3.2. ER

ER							
Kloon	N	Producent	Optimaal	Goed	Border-line	Onvoldoende	Aanvaardbaar*
Geconcentreerde antilichamen (n = 3)							
rm SP1	2	Cell Marque/Ventana/Roche	0	0	1	1	0/2
rm EP1	1	Dako/Agilent Technologies	1	0	0	0	1/1
Ready-To-Use antilichamen (n = 59)							
rm SP1	34	Cell Marque/Ventana/Roche	34	0	0	0	100%
rm EP1	22	Dako/Agilent Technologies	19	2	0	1	95%
mm SF11	2	Leica / Novocastra	1	0	1	0	1/2
Niet vermeld	1	Cell Marque/Ventana/Roche	1	0	0	0	1/1

(*) optimaal/goed

mm = mouse monoclonaal antilichaam

rm = rabbit monoclonaal antilichaam

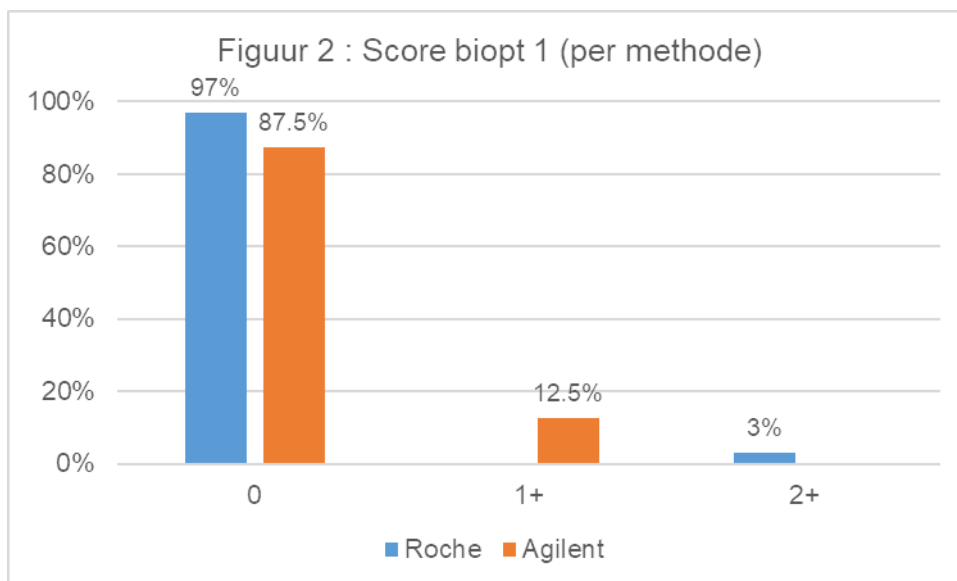
3.4. RESULTATEN VAN DE HER2 INTERPRETATIE

Eén laboratorium heeft de scores niet gerapporteerd.

3.4.1. Score biopt 1

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

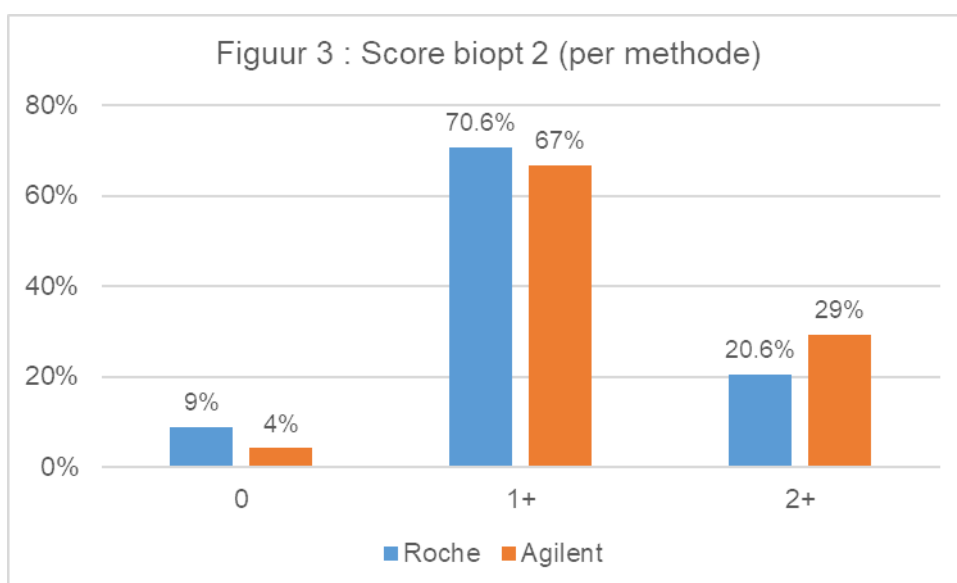
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	33	21	1
1+	0	3	0
2+	1	0	0
3+	0	0	0



3.4.2. Score biopt 2

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

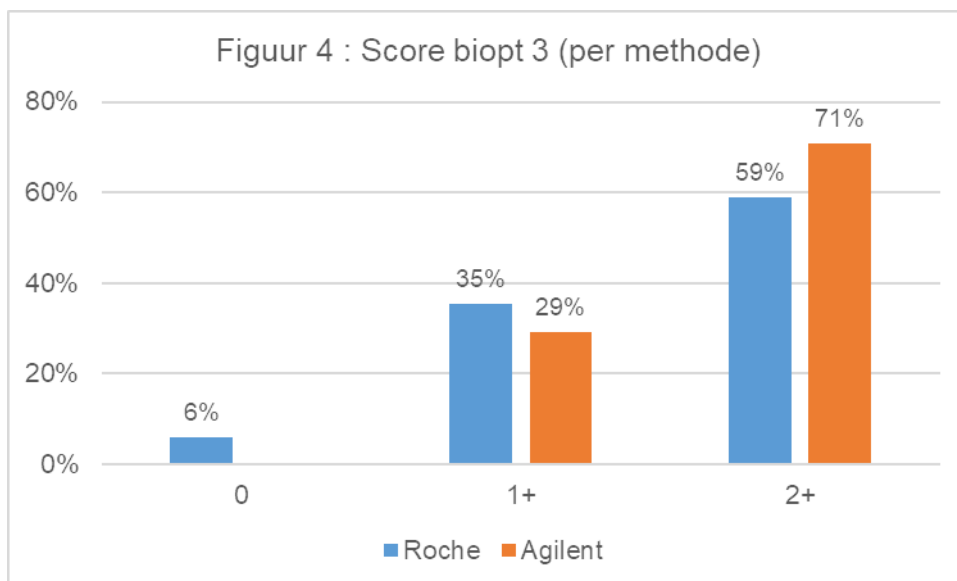
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	3	1	0
1+	24	16	0
2+	7	7	1
3+	0	0	0



3.4.3. Score biopt 3

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

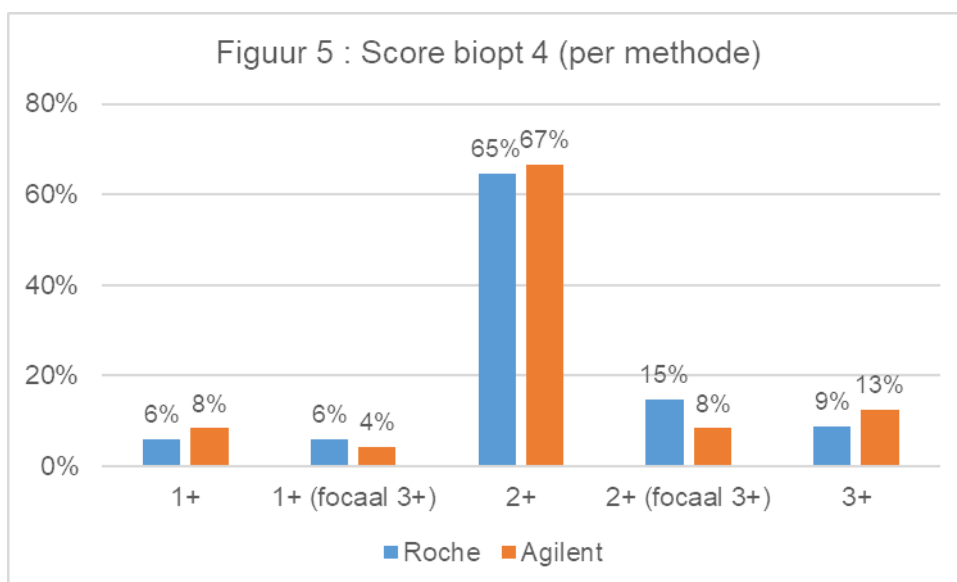
Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	2	0	0
1+	12	7	0
2+	20	17	1
3+	0	0	0



3.4.4. Score biopt 4

Het verwachte resultaat voor dit biopt was **score 2+ (focaal 3+)**.

Antwoorden	Roche (N)	Agilent (N)	Leica (N)
0	0	0	0
1+	2	2	0
1+ (focaal 3+)	2	1	0
2+	22	16	1
2+ (focaal 3+)	5	2	0
3+	3	3	0



3.4.5. Score biopt 5

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+	0	0	0
3+	34	24	1

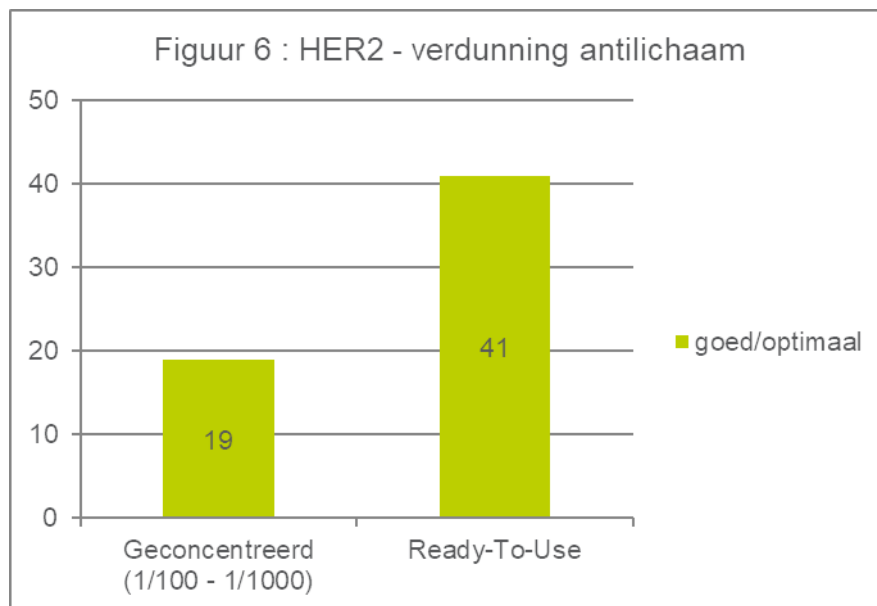
3.4.6. Guidelines gevolgd voor de interpretatie van de resultaten

Antwoorden	N
ASCO/CAP Guidelines 2007	0
ASCO/CAP Guidelines 2013	0
ASCO/CAP Guidelines 2018	50
Belgian Guidelines 2007	0
Belgian Guidelines 2014	7
Andere : ASCO/CAP Guidelines 2018 / Belgian Guidelines 2007	1
Niet vermeld	2

4. Bespreking van de resultaten

4.1. HER2

- De HER2 kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 60/60 deelnemers (100%) (zie figuur 1).
- De kleuring werd door alle laboratoria uitgevoerd d.m.v. een automaat.
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 56/60 deelnemers (93%). De controlecoupe was conform in 56/56 (100%) gevallen.
- De meest gebruikte antilichamen zijn kloon 4B5 (34/60 laboratoria of 57%) en het polyclonaal antilichaam A0485 (18/60 laboratoria of 30%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd in 19/60 laboratoria (32%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam in 41/60 laboratoria (68%) (zie figuur 6).

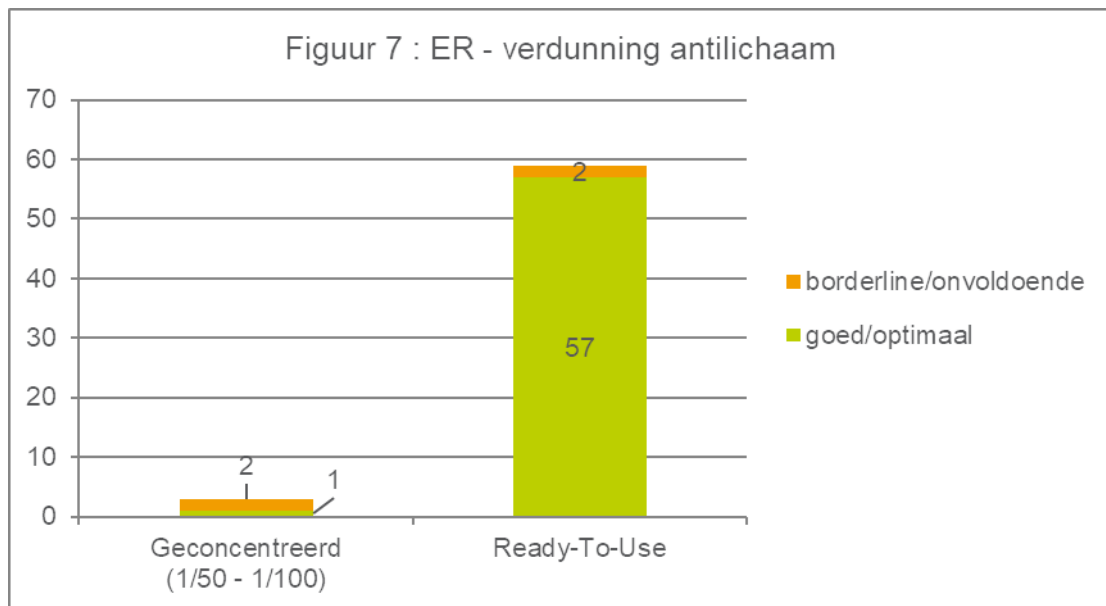


- Bij 2 laboratoria was subkloon 3+ van biopt 4 (2+/amplified) correct gekleurd en gescoord, maar kwam de kleuring van de andere cellen in dezelfde core niet overeen met de beoogde score 2+/amplified (te zwakke kleuring). De kleuring werd als 'goed' geëvalueerd, maar de deelnemers kregen een opmerking in hun individueel rapport.

4.2. ER

- De ER kleuring was van optimale of goede kwaliteit bij 58/62 deelnemers (94%) (zie figuur 1).
- De kleuring werd door alle laboratoria uitgevoerd d.m.v. een automaat.
- Er was een controlecoupe aanwezig bij 43/62 deelnemers (69%).

- De meest gebruikte klonen zijn SP1 (36/62 laboratoria of 58%) en EP1 (23/62 laboratoria of 37%).
- Een geconcentreerd antilichaam werd in 3/62 laboratoria (5%) gebruikt, een Ready-To-Use antilichaam in 59/62 laboratoria (95%) (zie figuur 6).



- 2 Laboratoria behaalden een onvoldoende resultaat, waarvan één laboratorium een geconcentreerd antilichaam gebruikte en één een RTU. Dit resultaat werd in beide gevallen getypeerd door vals positieve aankleuring (>1% positiviteit in biopt 6 en/of >10% positiviteit in biopt 4).
- 2 Laboratoria behaalden een borderline resultaat, waarvan één laboratorium een geconcentreerd antilichaam gebruikte en één een RTU. Dit resultaat werd in beide gevallen getypeerd door vals negatieve aankleuring in biopt 4 (<1% positiviteit).
- Cervix en tonsil worden door NordiQC aanbevolen als positieve en negatieve controle. Bijna alle epitheelcellen van het plaveiselcelepitheel en van de klieren van de cervix moeten matig tot sterk aankleuren, evenals de meeste stromale cellen. Endotheliale en lymfoïde cellen mogen niet aankleuren. Als bijkomende controle om de sensitiviteit te evalueren kan tonsil worden gebruikt : er moet minstens een zwakke tot matige aankleuring van verspreide cellen in de kiemcentra (meestal folliculaire dendritische cellen) en van het plaveiselcelepitheel aanwezig zijn. B-cellen in de mantelzones en in de kiemcentra mogen niet aankleuren.

4.3. HER2 INTERPRETATIE

- De consensus interpretatie van de deelnemers kwam overeen met het verwachte resultaat voor elk van de biopten :

Antwoorden	Biopt 1	Biopt 2	Biopt 3	Biopt 4	Biopt 5
Verwacht resultaat	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 = not amplified, A = amplified

- 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.
- 4 Laboratoria hebben biopt 4 (2+/amplified) foutief als 1+ geïnterpreteerd, hoewel de kleuring technisch in orde was en overeenkwam met een score 2+, mét aanwezigheid van de subkloon van 3+ cellen. De kleuring werd als 'optimaal' geëvalueerd, maar de deelnemers kregen een opmerking in hun individueel rapport.

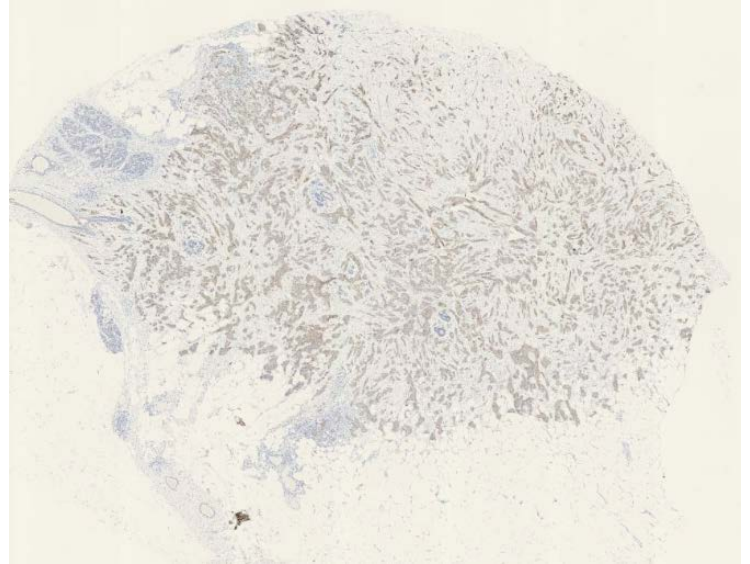
5. Beelden

HER2

Illustratie van de subkloon van 3+ cellen in biopt 4 : deze was niet aanwezig in de coupes die gebruikt werden voor vrijgave van de rondzending, maar wel in alle coupes van alle deelnemers.



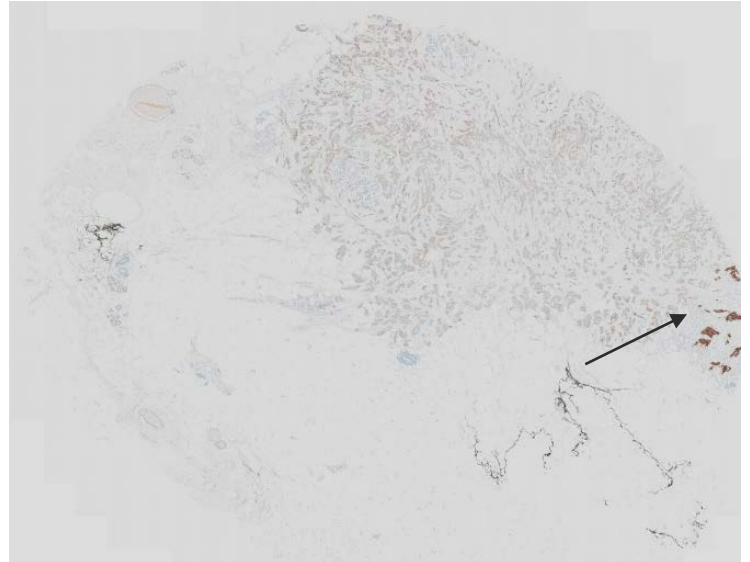
Biopt 4 : coupe vrijgave Roche



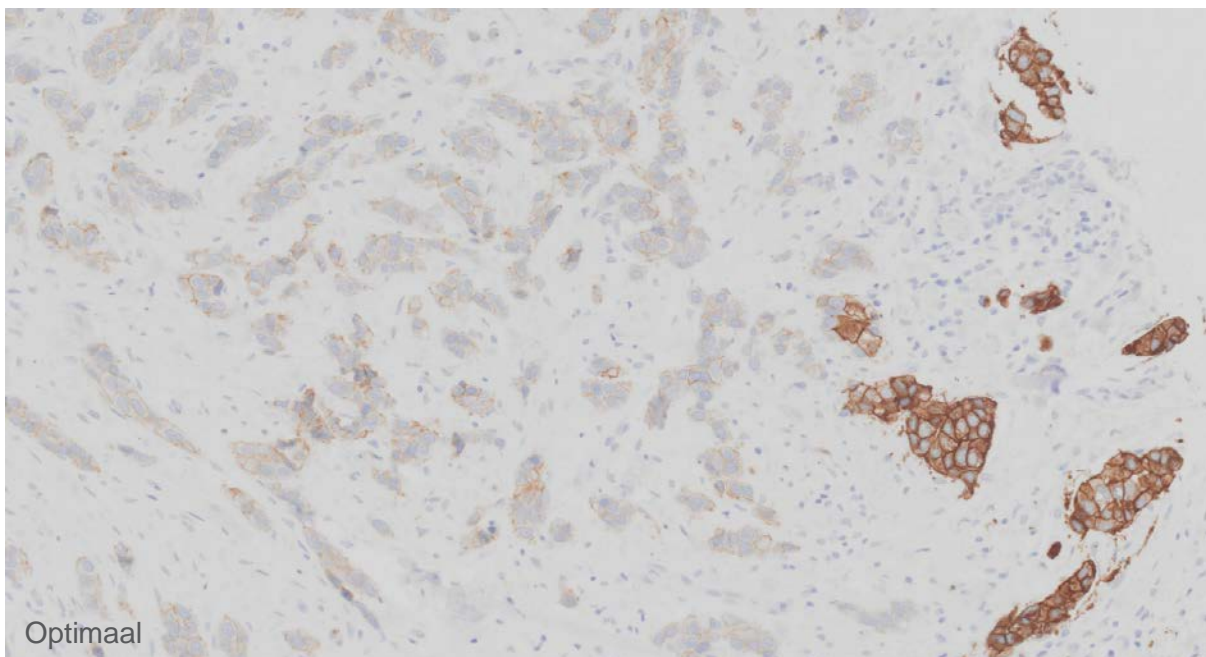
Biopt 4 : coupe vrijgave Agilent



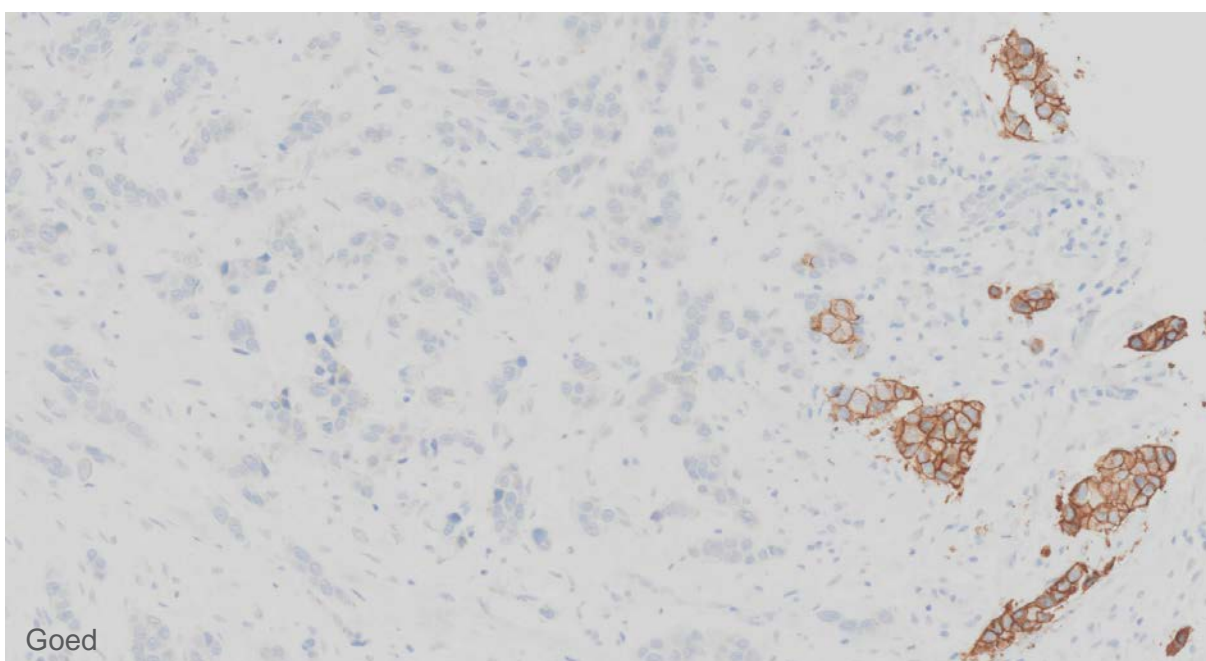
Biopt 4 : coupe van de eerste deelnemer (coupe 5)



Biopt 4 : coupe van de laatste deelnemer (coupe 70)

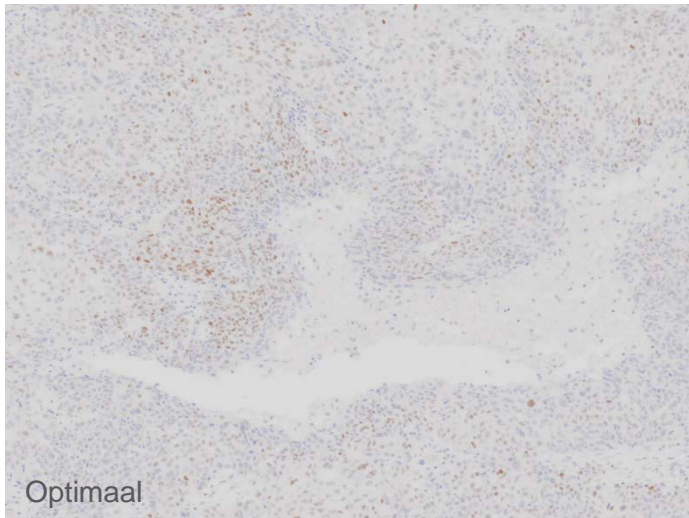


Biopt 4 (2+/amplified) : 2+ kleuring en de subkloon van 3+ cellen

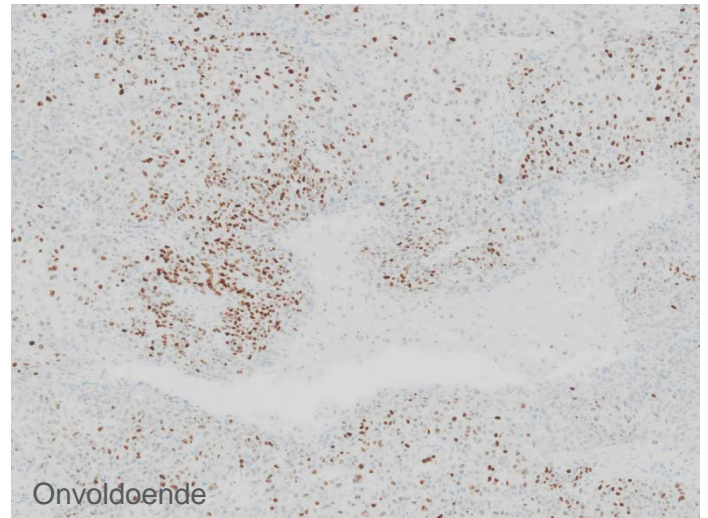


Biopt 4 (2+/amplified) : de kleuring van subkloon 3+ is correct maar de kleuring van de andere cellen in hetzelfde biopt komt niet overeen met de beoogde score 2+/amplified (te zwakke kleuring)

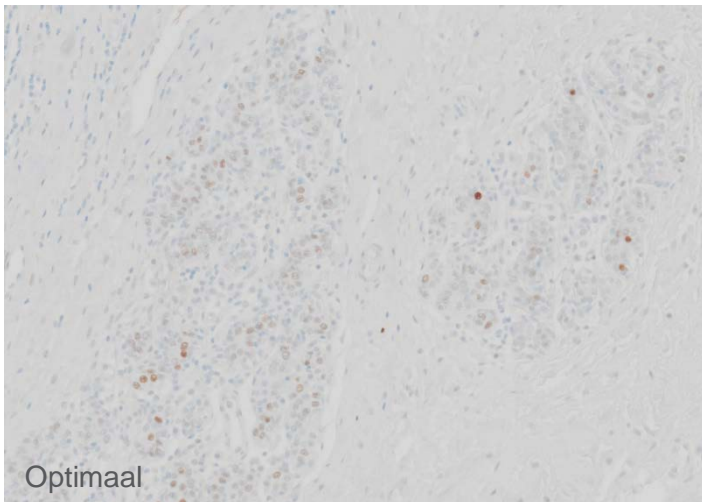
ER



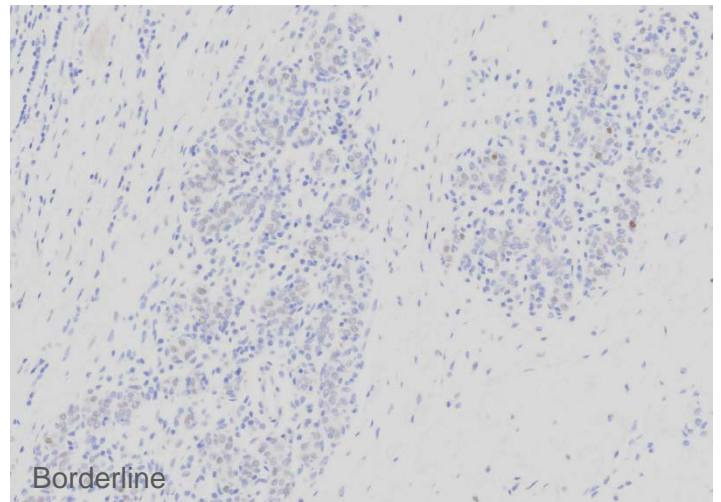
Biopt 4 : zwakke nucleaire aankleuring in 1-10% van de tumorale cellen (zwakke expressor)



Biopt 4 : vals positieve aankleuring (>10% positiviteit)



Biopt 4 : zwakke nucleaire aankleuring in 1-10% van de tumorale cellen (zwakke expressor)



Biopt 4 : vals negatieve aankleuring (<1% positiviteit)

EINDE

© Sciensano, Brussel 2022.

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.