

**Monica Haglund**, biomedicinsk analytiker, avdelningen för klinisk patologi och cytologi, Universitetssjukhuset MAS, Malmö (*monica.haglund@skane.se*)

**Gunilla Chebil**, överläkare, klinikchef, avdelningen för patologi och cytologi, Helsingborgs lasarett (*gunilla.chebil@helsingborgslasarett.se*)

**Leif Johansson**, överläkare, docent, patologisk/cytologiska kliniken, Universitetssjukhuset i Lund (*leif.g.johansson@skane.se*)

## HER2-testning för bröstcancer

# Kvalitetssäkrad analys av tillväxtfaktor erbjuds nu på svenska laboratorier

■ Drygt 6 000 kvinnor drabbas varje år av bröstcancer i Sverige. Vid bröstcancerdiagnostik bedömer patologen – utöver radikalitet, tumörtyp, storlek och histologisk grad – idag även andra egenskaper hos tumörcellerna. Dessa är ofta av prognostisk betydelse eller avgörande för valet av eventuell adjuvant terapi. Exempel på egenskaper som bedöms av patologen är förekomst av östrogen- och progesteronreceptorer samt överuttryck och/eller genamplifiering av human epidermal tillväxtfaktor 2 (HER2) [1]. Mellan 20 och 30 procent av all bröstcancer visar ett överuttryck av HER2 i tumörcellerna. HER2-proteinet fungerar som receptor för epidermala tillväxtfaktorer och har betydelse för celltillväxt och differentiering.

Det finns ett samband mellan överuttryck av HER2 och aggressiv bröstcancer med sämre prognos, snabbare recidiv och metastaser [2]. De metoder som används rutinmässigt för att bestämma överuttryck av HER2-tillväxtfaktorreceptorn är analys av tumörcellernas proteinuttryck med immunhistokemi eller analys av tumörcellernas genuttryck med fluorescens in situ-hybridisering (FISH). Uttryck på tumörcellerna av HER2-proteinet graderas i en fyrgradig skala, 0–3. Genuttrycket bedöms som amplifierat eller inte. Vid amplifiering av HER2-genen överuttrycks oftast proteinet HER2.

Trastuzumab är en biologiskt framställd monoklonal antikropp som blockerar funktionen av HER2-tillväxtfaktorreceptorn. Trastuzumab kan vara ett behandlingsalternativ för de patienter vars tumörer visar ett överuttryck av HER2-proteinet. Trastuzumab givet i kombination med kemoterapi vid tumörrecidiv ger signifikant förbättrad överlevnad och längre tid till sjukdomsprogress [3]. För patienter med normalt uttryck av HER2 i tumörvävnaden är behandling med trastuzumab inte meningsfull [4, 5].

### Kvalitetssäkringsprojektet HER 2001

Under hösten 1999 bildades på initiativ av Karolinska Universitetssjukhuset en referensgrupp med patologer och biomedicinska analytiker från samtliga sjukvårdsregioner och universitetssjukhus i landet med avsikt att dela erfarenheter kring HER2-testning, ta del av nya tekniker och metoder samt dra upp nationella riktlinjer för hur kvalitetssäkrad testning skall genomföras.

Flera patologiska laboratorier är anslutna till internatio-

### Sammanfattat



Mellan 20 och 30 procent av all bröstcancer uppvisar ett överuttryck av tillväxtfaktorn HER2 i tumörcellerna, vilket innebär en aggressivare form av cancer.

Vid återfall i bröstcancer som överuttrycker HER2 kan trastuzumab vara ett behandlingsalternativ.

Inför sådan behandling måste uttrycket av HER2 kvantifieras på histopatologiska snitt med immunhistokemiska och/eller molekylärbiologiska metoder. Undersökningen görs på patologilaboratorier.

Flera faktorer kan påverka resultatet av HER2-analyser, såsom valet av antikropp eller prob, personalens kompetens och bedömarens erfarenhet.

Nationella riktlinjer för HER2-testning finns utarbetade och publicerade i många länder. Denna artikel beskriver en serie kvalitetssäkringsprojekt som lett till att svenska riktlinjer för HER2-testning formulerats och att man därmed numera på olika svenska patologilaboratorier kan erbjuda likartade och tillförlitliga analysmetoder avseende HER2-status.

nella kvalitetssäkringsprogram för immunhistokemiska analyser, men program för molekylärbiologiska analyser på histopatologiskt material saknas. Inom ramen för den nationella referensgruppen för HER2-analyser genomfördes under 2001–2002 ett kvalitetssäkringsprojekt, HER 2001-projektet. Nio patologiska laboratorier anslöt sig till detta kvalitetssäkringsprojekt.

Projektet började den 1 oktober 2001 och pågick under tolv månader. De nio deltagande laboratorerna fick utskick av arkiverat tumörmaterial, för vilka en redan genomförd HER2-analys fungerade som facit. Fem av utskickerna var ana-

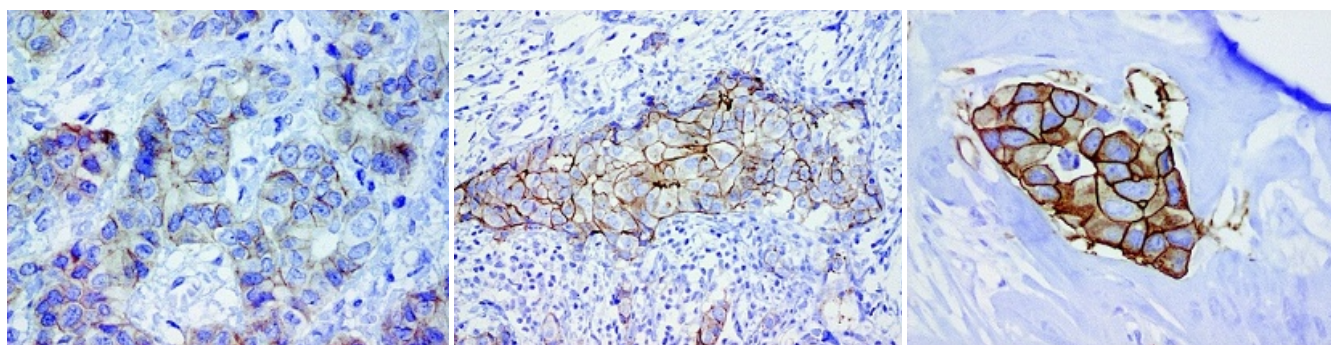
## II Fakta 1

### Poängberäkning av HER2, immunhistokemi

Poäng (score)	Infärgningsmönster
0	Ingen infärgning eller <10 procent partiell infärgning i tumörcellernas plasmamembran
1+	Svag partiell infärgning i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran
2+	Svag till måttlig komplett infärgning i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran
3+	Stark komplett infärgning i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran

**Tabell I.** Jämförande resultat av den första (HER 2001) och den senaste (HER 2003) omgången av HER- kvalitetsutskick.

	Överensstämmelse, procent	Bedömbarhet, procent	Falskt positivt resultat, procent	Falskt negativt resultat, procent
<i>Immunhistokemi</i>				
<b>HER 2001</b>				
Utskick 1 till och med 6 med totalt 24 tumörer	60	100	13	11
<b>HER 2003</b>				
Tissue array med 10 tumörer	96	100	1,25	2,5
<i>FISH-analys</i>				
<b>HER 2001</b>				
Utskick 1 till och med 6 med totalt 24 tumörer	60	86	2	9
<b>HER 2003</b>				
Tissue array med 10 tumörer	99	97	1	0



**Figur 1.** Immunfärgning av HER2-antigen i bröstcancer. Vänster: Svag partiell infärgning (1+) i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran. Mitten: Måttlig komplett infärgning (2+) för HER2 i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran. Höger: Stark, komplett infärgning (3+) för HER2 i >10 procent av tumörcellernas plasmamembran.

lyserade med Southern blot-metod och ett med tidigare utförd immunanalys.

Sammanlagt gjordes sex utskick med vardera fyra tumörer, som undersöktes med såväl immunhistokemi som FISH. Bedömning av färgningarna gjordes lokalt på de deltagande laboratorerna och rapporterades därefter till en central instans, som sammanställde resultaten. Resultatet bedömdes med hänsyn till överensstämmelse och bedömbarhet. För immunhistokemi har den fyrgradiga skalan 0–3 (Fakta 1) brutits ner på två grader, negativt (0–1+) eller positivt (2–3+), och FISH har angetts som amplifierat eller inte amplifierat.

Sammantaget blev resultaten av de sex utskicken (Tabell I) att i 60 procent av fallen visade samtliga laboratorier överensstämmande immunhistokemiska resultat 0–1+/2–3+. I 60 procent av fallen visade samtliga laboratorier överensstämmande FISH-resultat (ej amplifierade/amplifierade). Bedömbarheten avseende immunhistokemi var 100 procent och avseende FISH-analys 86 procent.

Det största enskilda problemet i den första testgenomgången var icke-bedömbare resultat med FISH. Detta kan till en del förklaras av att flera av de deltagande laboratorerna då hade mycket begränsad erfarenhet av metoden. Falskt positiva liksom falskt negativa resultat med immunhistokemi sammanhängande med såväl suboptimal metod som avvikelser i bedömning av infärgningen.

Sedan kvalitetssäkringsprojekt HER 2001 avslutats i oktober 2002 beslutade referensgruppen att fortsätta med kvalitetsarbeten för HER2-analyserna. En arbetsgrupp bildades med uppgift att fortsätta arbetet med kvaliteten av analyser-

na. I arbetsgruppen på åtta personer ingår förutom patologer och biomedicinska analytiker representanter från onkologi.

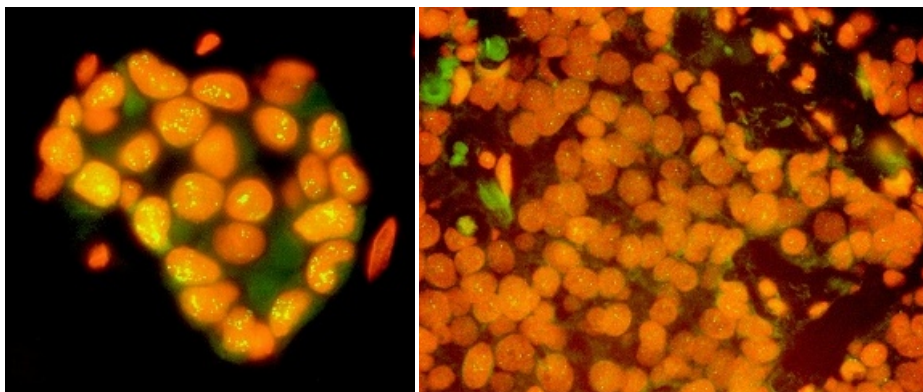
## II Metod

Under år 2003 gjordes dels ett vävnadsutskick, dels en enkätundersökning. Den senare innehöll bl a frågor om antal utförda analyser per år och hur man följer de nationella rekommendationerna. Vävnadsutskicket bestod av formalinfixerat, paraffinbäddat material från tio olika fall av bröstcancer från Universitetssjukhuset MAS i Malmö. Alla tio fallen utgjordes av duktal bröstcancer men med varierande malignitetsgrad. Samtliga fall var tidigare analyserade med immunhistokemi och nio av dem även med FISH. Vävnadsutskicket konstruerades i form av en »tissue array-kloss« – en metod som tillåter att alla tio fall bäddas in i samma kloss. Detta underlättar såväl snittning och färgning som bedömning. Materialet analyserades med immunhistokemi och FISH, vartefter analysresultaten bedömdes på de enskilda laboratorerna. Åtta referenslaboratorier deltog.

Arbetsgruppen sammanställde laboratorernas resultat med hänsyn tagen till överensstämmelse och bedömbarhet. För immunhistokemi har den fyrgradiga skalan (0–3) brutits ned på två grader, negativt (0–1+) eller positivt (2–3+) och FISH har angetts som amplifierat eller inte amplifierat.

## II Resultat

Resultaten framgår av Tabell I. Av totalt 80 immunhistokemiskt analyserade prov avvek bedömningen endast för tre, vilket ger en överensstämmelse på 96 procent. Samtliga ana-



**Figur 2.** Vänster: FISH-analys av bröstcancer som är amplifierad för HER2-genen. Man ser ett stort antal genkopior i form av lysande gula punkter i varje cell. Mer än sex genkopior i varje cell definieras som amplifierat med denna metod. Höger: FISH-analys av bröstcancer med normalt antal kopior av HER2-genen. Man ser i genomsnitt två genkopior i varje cell som lysande gula punkter.

lyser var bedömbara. I FISH avvek endast ett prov, vilket medför en nära 99-procentig överensstämmelse mellan laboratorerna, och 97 procent av analyserna var bedömbara.

Enkätundersökningen visade att referenslaboratorierna i stort sett följer de rekommendationer som finns samt beaktar vikten av provets ingående kvalitet och att adekvat kontrollmaterial används vid analyserna. Det finns ersättare för den personal som hanterar analyserna, och laboratorerna har kapacitet att inom tio arbetsdagar utföra och besvara en HER2-frågeställning. En viktig del av enkäten behandlade frågor kring extern och intern kvalitetskontroll, vilket ledde till att referensgruppen skall arbeta fram ett dokument med riktlinjer och definitioner för extern och intern kvalitetskontroll för HER2-analyser.

## II Diskussion

Immunhistokemiska metoder har sedan länge använts inom histopatologisk diagnostik men huvudsakligen som kvalitativ metod. Immunhistokemiska och molekylärbio-logiska analyser av HER2 är däremot exempel på s k farmakodiagnostiska test. Dessa omfattar såväl kvalitativa som semikvantitativa parametrar.

Övertryck av proteinet (immunhistokemi) bedöms enligt en skala där hänsyn tas till: 1) andelen infärgade invasiva tumörceller, 2) huruvida infärgningen är partiell eller omfattar hela tumörcellens cirkumferens och 3) intensiteten i infärgningen (Figur 1) [6, 7]. Ett flertal såväl mono- som polyclonala antikroppar mot HER2-proteinet finns kommersiellt tillgängliga. Förbehandlingsprotokoll, automatiserad immunhistokemisk färgningsprocedur, val av antikropp, antikroppsspädning, inkubationstider etc varierar mellan olika laboratorier.

Analys av HER2 på gennivå (molekylärbio-logi) utförs med in situ-hybridisering på snitt från formalinfixerat, paraffinbäddat tumörmaterial [8, 9]. De kommersiellt tillgängliga proverna för HER2-genen är konjugerade antingen till en fluorokrom som kan detekteras i fluorescensmikroskop, FISH, (Figur 2) eller till en kromogen som detekteras i ljusmikroskopiskt, CISH. Med denna teknik kvantifieras antalet kopior av HER2-genen i enskilda tumörceller. In situ-hybridiseringstekniken har tidigare använts tämligen sparsamt inom histopatologisk rutindiagnostik, varför erfarenheterna av metoden varit begränsade utanför forskningslaboratorierna.

Bestämning av HER2 är behandlingsprediktivt (farmakodiagnostiskt test) vid bröstcancer. Mot bakgrund av detta bildades »referensgruppen för HER2-analyser« med målsättningen att det skulle finnas kliniskt patologisk kompetens för HER2-analyser, inkluderande FISH, vid minst ett laboratorium inom varje sjukvårdsregion. Sådan kliniskt patologisk kompetens förutsätter adekvat utrustning, kapacitet att utföra analyserna och adekvat antal utförda analyser per år. Därtill

behövs kompetens för bedömning, validerade metoder samt program för intern och extern kvalitetskontroll.

### Lokal testning har fördelar

Centralisering av HER2-analyser har diskuterats och övervägts. Lokal eller regional testning har dock fördelar, såsom kontrollerad vävnadspreparation, snabbare resultat och direkt återkoppling till lokalt verksamma onkologer inom ramen för rutinmässig konferensverksamhet. Med investering i utbildning, träning och erfarenhetsutbyte samt implementering av intern kvalitetskontroll och externa kvalitetsäkringsprogram finns goda förutsättningar för standardiserade, reproducerbara HER2-analysresultat även i decentraliserad form [10]. Skillnader i utfall av immunhistokemi och FISH är laboratorieberoende och beror inte i första hand på metoderna som sådana [11, 12].

### Nio referenslaboratorier i Sverige

HER2-analyserna utförs numera rutinmässigt på referenslaboratorierna. Erfarenheterna, såväl laborietekniskt som bedömningsmässigt, har efter hand ökat och givit alltmer reproducerbara resultat. Kvalitetssäkringsarbetet visar också att kompetens finns och att referenslaboratorierna kan uppvisa analysresultat med hög och jämn reproducerbarhet.

FISH-analys finns etablerad vid följande patologikliniker som åtagit sig att tills vidare fungera som konsultlaboratorier:

- Norrlands Universitetssjukhus, Umeå
- Akademiska sjukhuset, Uppsala
- Karolinska Universitetssjukhuset Solna
- Universitetssjukhuset, Örebro
- Universitetssjukhuset i Linköping
- Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg
- Länssjukhuset, Kalmar
- Universitetssjukhuset i Lund
- Universitetssjukhuset MAS, Malmö

### Nationella rekommendationer för HER2-testning

HER2-status undersöks primärt med immunhistokemisk metod. Provets fixeringstid skall vara kontrollerad, 24–72 timmar. Extern kontroll, vävnads- eller cellinjekontroll, såväl positiv av flera grader som negativ, färgas med varje fall.

De prov som utfaller 0–1+ rapporteras som negativa. Verifiering med in situ-hybridisering, FISH, görs i de fall som utfaller 2–3+ samt alla svårvärderade fall (gammalt arkivmaterial, provtyper som genomgått avvikande fixering och hantering).

Svensk förening för patologi publicerar rekommendationerna på sin webbplats. Referensgruppen planerar nya möten för att följa upp kunskapsutvecklingen inom området och övervaka rekommendationernas aktualitet. De svenska re-

kommendationerna är under bearbetning och kommer att modifieras för att vartefter anslutas till dem som tillämpas internationellt [11].

\*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Kvalitetssäkringsprojekten HER 2001 och HER 2003 har genomförts med benäget bistånd från respektive deltagares hemkliniker samt från Roche AB.

## Referenser

1. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1865-78.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival, with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
4. Vogel CL, Cobleigh D, Trupaty D, Mass R, Murphy M, Stewart SJ. Superior outcomes with Herceptin (trastuzumab) in fluorescence in situ hybridisation (FISH)-selected patients [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:22a.
5. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001;19:2714-21.
6. Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, Walker R, Cooke T, Gullick W, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2000;53:890-2.
7. Rhodes A, Jasani B, Anderson E, Dodson A, Balaton A. Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol* 2002;118:408-17.
8. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridisation. *Oncogene* 1996;13:73-2.
9. Persons D, Bui M, Lowery M, Mark HF, Yung JF, Birkmeier JM, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:41-8.
10. Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Couturier J, Arnould L, Denoux Y, Fiche M, et al. Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer: results of the French multicentre GEPICs study. *Histopathology* 2003;42:337-47.
11. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16:173-82.
12. Yaziji H, Gown AM. Accuracy and precision in HER2/neu testing in breast cancer: are we there yet? *Hum Pathol* 2004;35:143-6.



=artikeln är referentgranskad

## SUMMARY

Between 20 and 30 per cent of all breast cancers show an overexpression of the growth factor HER2 and this implies a worse prognosis. Metastasising breast cancer that overexpress HER2 can effectively be treated with trastuzumab (Herceptin). In order to determine whether this treatment is indicated, HER2 expression must be quantified with immunohistochemical or molecular biological methods. Several factors may influence the laboratory analysis of HER2, such as choice of antibodies and probes, the reliability of the test performance itself and the performance of the pathologist(s) interpreting the test. National guidelines for HER2 testing have been published in several countries. In this article a series of quality assurance projects leading to the formulation of Swedish guidelines for HER2 testing is described. These projects have demonstrated that several Swedish pathology laboratories can reliably perform and interpret analysis of HER2 status today.

**Monica Haglund, Gunilla Chebil, Leif Johansson**

Correspondence: Leif Johansson, Patologisk/cytologiska kliniken, Universitetssjukhuset, SE-221 85 Lund, Sweden ([leif.g.johansson@skane.se](mailto:leif.g.johansson@skane.se))