

Bachelorproef

Optimalisatie en validatie van HHV8- en BAP1-IHC op het Dako Omnis toestel

Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) - Synaps Park 1, 3600 Genk
Promotors: Leen Rasking & Doris Peters

Alyssia Lespes

Departement GDT
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie
Afstudeerrichting Medische Laboratoriumtechnologie

2024-2025

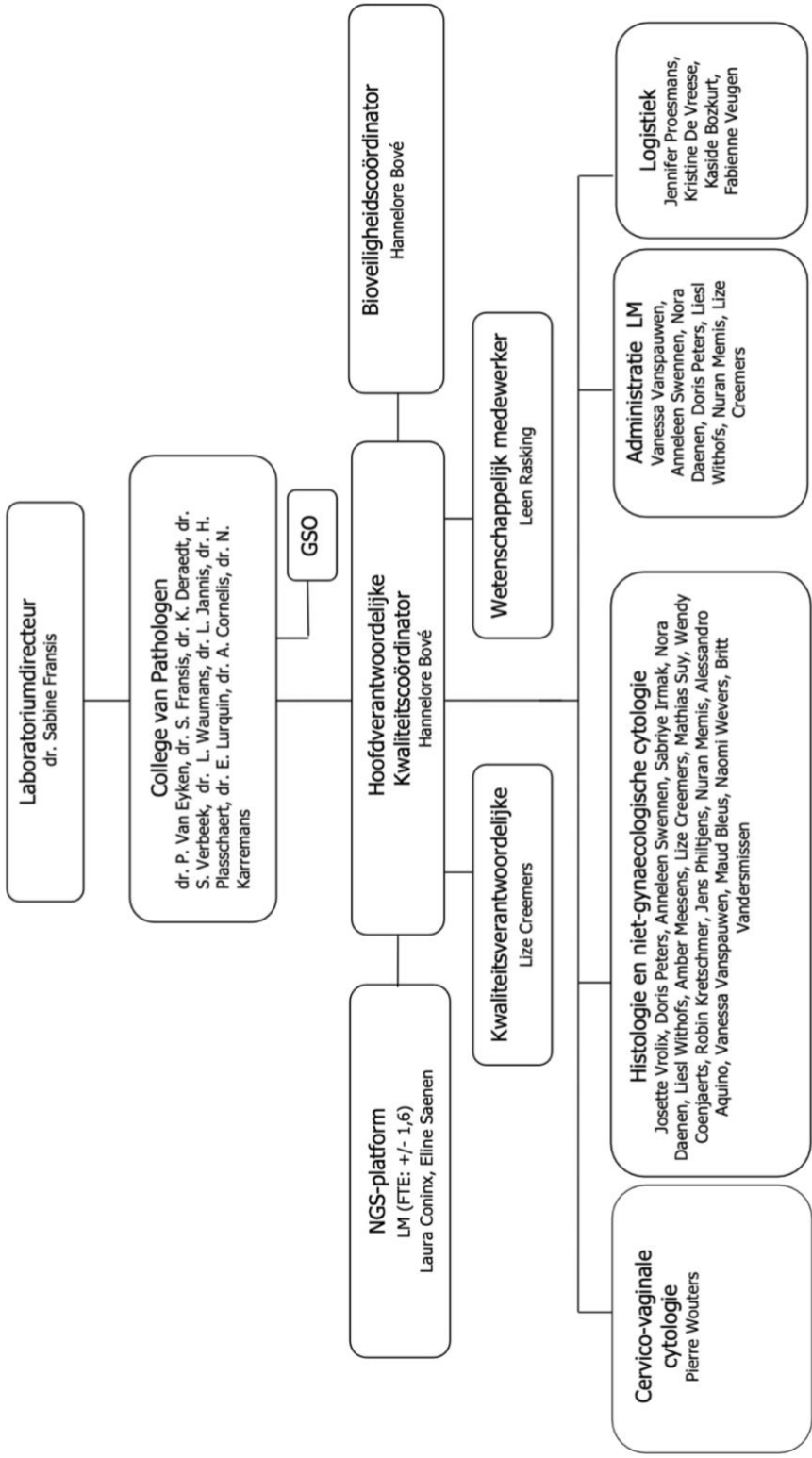
VOORWOORD

De bacheloronderzoek werd uitgevoerd tijdens mijn stage in het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) op de afdeling anatomo-pathologie. Ik ben dankbaar voor de kans die ik kreeg om mijn kennis en vaardigheden verder te ontwikkelen in een professionele en stimulerende omgeving. Het onderzoek richtte zich op de optimalisatie en validatie van een immunohistochemisch kleuringprotocol voor de antilichamen HHV8 en BAP1, een belangrijke stap in het verbeteren van diagnostische processen binnen de pathologie.

Ik wil mijn oprechte dank betuigen aan de medewerkers van het anatomo-pathologisch laboratorium van het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) voor hun begeleiding, expertise en het mogelijk maken van dit onderzoeksproject. In het bijzonder wil ik mijn stagebegeleiders, Leen Rasking en Doris Peters, bedanken voor hun ondersteuning, deskundige feedback en het delen van hun uitgebreide kennis gedurende mijn stageperiode.

Dit onderzoek zou niet mogelijk zijn geweest zonder de samenwerking met het ZOL en de waardevolle ervaring die ik daar heb opgedaan. Ik kijk ernaar uit om de kennis die ik heb verworven toe te passen in mijn toekomstige carrière in de biomedische en medische wetenschappen.

ORGANIGRAM



INHOUDSTAFEL

1	AFKORTINGEN	5
2	ABSTRACT (EN)	6
3	ABSTRACT	7
4	INLEIDING	8
5	LITERATUURSTUDIE	9
5.1	<i>Immunohistochemie in diagnostiek en behandeling</i>	9
5.2	<i>Validatie van antilichamen in immunohistochemie</i>	9
5.3	<i>Diagnostische toepassingen en validatie van HHV8 antilichamen</i>	10
5.4	<i>BAP1 als diagnostisch en prognostisch hulpmiddel in tumordiagnostiek.....</i>	12
6	EXPERIMENTEEL DEEL	14
6.1	<i>Algemene procedure IHC-kleuring</i>	14
6.2	<i>Werking Dako Omnis</i>	15
6.3	<i>Materialen en methoden</i>	15
6.4	<i>Resultaten</i>	17
6.4.1	<i>Optimalisatie HHV8</i>	18
6.4.2	<i>Optimalisatie BAP1</i>	19
6.4.3	<i>Validatie HHV8</i>	20
6.4.4	<i>Validatie BAP1</i>	21
6.5	<i>Discussie</i>	23
6.5.1	<i>Optimalisatie HHV8</i>	23
6.5.2	<i>Optimalisatie BAP1</i>	24
6.5.3	<i>Validatie HHV8</i>	25
6.5.4	<i>Validatie BAP1</i>	25
6.6	<i>Conclusie</i>	26
7	REFERENTIES	28
8	BIJLAGEN	33
9	LOGBOEK	47

1 AFKORTINGEN

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BAP1	BRCA1-geassocieerd eiwit-1
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
FFPE tissue	Formaline-gefixeerd paraffine ingebed weefsel
HHV8	Humaan herpesvirus 8
HIER	Heat-Induced Epitope Retrieval
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunohistochemie
ISH	In situ hybridisatie
KSHV	Kaposi's sarcoom-geassocieerd herpesvirus
LANA	Latent Nucleair Antigeen
MCD	Multicentrisch Castleman-syndroom
NGS	Next-Generation Sequencing
PEL	Primair effusie-lymfoom

2 ABSTRACT (EN)

Immunohistochemistry (IHC) is a critical technique in pathology used to detect specific proteins in tissue samples. This study focuses on the optimization and validation of the antibodies Human herpesvirus 8 (HHV8) and BRCA1-associated protein-1 (BAP1) on the automated Dako Omnis system (Agilent Technologies), with the aim of developing a reliable IHC protocol for diagnostic use. HHV8, an oncogenic virus associated with Kaposi's sarcoma, and BAP1, a tumor suppressor protein, play a key role in the diagnosis of various malignancies. The study includes the analysis of 20 tissue samples per antibody, divided into positive and negative cases, and utilizes horseradish peroxidase (HRP) and diaminobenzidine (DAB) as detection systems. The validation criteria include the assessment of accuracy, whereby pathologists automatically evaluate both the sensitivity and specificity of the stainings.

The results demonstrate that optimization of the HHV8 protocol through an adjusted incubation time leads to reliable staining of positive control samples. Similarly, the BAP1 protocol was successfully validated, showing positive expression in epithelial cells. The validation of both HHV8 and BAP1 met the predefined acceptability criteria, confirming the applicability of the IHC staining protocols for diagnostic purposes. This study provides a robust and reproducible protocol for both antibodies on the Dako Omnis system, contributing to improved diagnostic accuracy in pathology. Moreover, the protocol specifically enhances diagnostic workflow within the anatomic pathology laboratory at Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL).

Keywords: Antibodies, BAP1, Dako Omnis, HHV8, Immunohistochemical staining, Optimization, Validation.

3 ABSTRACT

Immunohistochemie (IHC) is een essentiële techniek in de pathologie voor het detecteren van specifieke eiwitten in weefselmonsters. Dit onderzoek richt zich op de optimalisatie en validatie van de antilichamen humaan herpesvirus 8 (HHV8) en BRCA1-geassocieerd eiwit-1 (BAP1) op het geautomatiseerde Dako Omnis-systeem (Agilent Technologies), met als doel een betrouwbaar IHC-protocol te ontwikkelen voor diagnostisch gebruik. HHV8, een oncogeen virus geassocieerd met Kaposi's sarcoom, en BAP1, een tumorsuppressoreiwit, spelen een belangrijke rol in de diagnostiek van diverse maligniteiten. Het onderzoek omvat de analyse van 20 weefselstalen per antilichaam, verdeeld over positieve en negatieve stalen, en maakt gebruik van horseradish peroxidase (HRP) en diaminobenzidine (DAB) als detectiesystemen. De validatiecriteria omvatten de beoordeling van de juistheid, waarbij pathologen automatisch zowel de sensitiviteit als de specificiteit van de kleuringen evalueren.

De resultaten tonen aan dat de optimalisatie van het HHV8-protocol met een aangepaste incubatietijd resulteert in een betrouwbare kleuring van positieve controlemonsters. Evenzo werd het BAP1-protocol gevalideerd met succes, waarbij positieve expressie in epitheliale cellen werd waargenomen. De validatie van zowel HHV8 als BAP1 voldeed aan de gestelde aanvaardbaarheidscriteria, waardoor de toepasbaarheid van de IHC-kleuringen voor diagnostische doeleinden wordt bevestigd. Dit onderzoek levert een robuust en reproduceerbaar protocol voor beide antilichamen op het Dako Omnis-systeem, wat bijdraagt aan de verbetering van de diagnostische nauwkeurigheid in de pathologie. Daarnaast draagt dit protocol specifiek bij aan de optimalisatie van de diagnostische processen binnen het labo anatomo-pathologie in het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL).

Sleutelwoorden: Antilichamen, BAP1, Dako Omnis, HHV8, Immunohistochemische kleuring, Optimalisatie, Validatie.

4 INLEIDING

Immunohistochemie (IHC) is een veelgebruikte techniek in de pathologie om specifieke eiwitten in weefsels aan te tonen. Dit onderzoek richt zich op de optimalisatie en validatie van de antilichamen HHV8 en BAP1 op het Dako Omnis (Agilent Technologies) toestel, met als doel een betrouwbaar IHC-protocol te ontwikkelen.

Het humaan herpesvirus 8 (HHV8) is een oncogeen virus dat in verband wordt gebracht met Kaposi's sarcoom en andere ziekten. De detectie ervan via IHC is cruciaal voor de diagnostiek. BRCA1-geassocieerd eiwit-1 (BAP1) is een tumorsuppressoreiwit dat een rol speelt bij verschillende maligniteiten, zoals mesothelioom. Het verlies van nucleaire BAP1-expressie wordt beschouwd als een diagnostische en prognostische merker.

Voor dit onderzoek worden in totaal 20 weefselstalen per antilichaam geanalyseerd, bestaande uit positieve en negatieve stalen. De IHC-kleuring vindt plaats op formaline-gefixeerde paraffine-gebedde (FFPE)-weefselcoupes met het Dako Omnis toestel, waarbij horseradish peroxidase (HRP) en diaminobenzidine (DAB) als detectiesysteem worden gebruikt. De kwaliteit en diagnostische waarde van de kleuringen worden beoordeeld door pathologen. De resultaten bepalen of het protocol voldoet aan de aanvaardbaarheidscriteria.

Om IHC-kleuringen betrouwbaar in te zetten, is optimalisatie en validatie noodzakelijk. Dit onderzoek onderzoekt hoe een robuust en reproduceerbaar protocol kan worden ontwikkeld voor HHV8 en BAP1 op het Dako Omnis toestel. Dit moet resulteren in een specifieke en gevoelige kleuring die pathologen ondersteunt bij een nauwkeurige diagnose.

De centrale onderzoeksvraag luidt: "Hoe kan een optimaal immunohistochemisch kleuringprotocol voor de antilichamen HHV8 en BAP1 worden opgesteld, geoptimaliseerd en gevalideerd op het Dako Omnis toestel voor een betrouwbare toepassing op patiëntenstalen?"

Tot slot wordt in het besluit geëvalueerd in hoeverre de doelstellingen zijn bereikt en welke eventuele aanpassingen nodig zijn voor verdere verbetering.

5 LITERATUURSTUDIE

5.1 Immunohistochemie in diagnostiek en behandeling

IHC is een techniek die veel wordt gebruikt voor het opsporen van specifieke eiwitten in weefselmonsters. Volgens Hussaini et al. in 2023 is het principe gebaseerd op de interactie tussen een antilichaam en het bijbehorende antigeen in het weefsel. Na deze binding wordt het complexe antigeen-antilichaam zichtbaar gemaakt door detectiemethoden, waarbij vaak enzymatische labels zoals peroxidase of alkalische fosfatase worden gebruikt. IHC kan worden toegepast op FFPE-weefsels en biedt de mogelijkheid om meerdere antigenen tegelijk te detecteren (Hussaini et al., 2023).

IHC wordt niet alleen gebruikt in diagnostische pathologie, maar speelt ook een belangrijke rol in prognostische en voorspellende toepassingen. Biomarkers die via IHC worden gedetecteerd, zijn van essentieel belang voor het bepalen van het ziekte stadium, het selecteren van behandelingen en het voorspellen van de uitkomst bij patiënten (Hussaini et al., 2023). De uitkomsten van IHC hebben directe gevolgen voor het behandelplan en de zorg van patiënten, waardoor het een waardevolle techniek is in de klinische praktijk. Daarom is deze techniek cruciaal voor zowel de diagnose als de voortzetting van de behandeling en vormt het een onmisbaar hulpmiddel in de moderne pathologie (Bordeaux et al., 2010).

5.2 Validatie van antilichamen in immunohistochemie

Bordeaux et al. (2010) benadrukt dat het valideren van antilichamen cruciaal is voor zowel wetenschappelijk onderzoek als klinische toepassingen. Antilichamen zijn veelgebruikte reagentia in laboratoria, maar het ontbreken van gestandaardiseerde richtlijnen voor validatie kan leiden tot inconsistenties tussen de vermelde specificaties van commerciële antilichamen en hun werkelijke prestaties. Voor een succesvolle validatie moet een antilichaam aantonen dat het specifiek, selectief en reproduceerbaar is in een bepaalde context. Dit betekent dat het antilichaam de doel-eiwitten op een betrouwbare manier moet herkennen zonder kruisreacties met andere moleculen (Bordeaux et al., 2010).

Bij IHC wordt standaardisatie bemoeilijkt door verschillende factoren die invloed hebben op de kleuring. Zo kunnen pre-analytische variabelen zoals de tijd tussen weefselverwerking en fixatie, het type fixatief en de verwerking van weefsel de antigeniciteit van het monster beïnvloeden, wat de betrouwbaarheid van de testresultaten verstoort (Bordeaux et al., 2010). Antigeniciteit verwijst naar het vermogen van een antigeen om zich te binden aan een antilichaam en in sommige gevallen een

immuunrespons op te wekken (Rao, 1972). Analytische factoren, waaronder het gebruik van verschillende antilichaamklonen, verdunningen, antigenretrievaltechnieken en detectiesystemen, spelen ook een belangrijke rol in het verkrijgen van betrouwbare resultaten. Ook de manier waarop de resultaten worden geïnterpreteerd, zoals de drempelwaarde voor positieve kleuring, kan variatie veroorzaken in IHC-metingen (Leong A. S, 2004; Shi et al., 2007).

Een goede validatie van antilichamen, waarbij alle belangrijke aspecten worden meegenomen, is volgens Bordeaux et al. (2010) nodig om betrouwbare en herhaalbare resultaten te krijgen. Dit is vooral belangrijk in diagnostische en prognostische toepassingen. Door goed gevalideerde antilichamen te gebruiken, wordt de nauwkeurigheid van IHC-assays vergroot. Het belang van antilichaamvalidatie gaat verder dan wetenschappelijk onderzoek, het heeft directe invloed op klinische beslissingen en de zorg voor patiënten (Bordeaux et al., 2010).

5.3 Diagnostische toepassingen en validatie van HHV8 antilichamen

Een specifiek voorbeeld waarin antilichaamvalidatie van groot belang is, betreft de detectie van HHV8. Dit virus, ook wel Kaposi's sarcoom-geassocieerd herpesvirus (KSHV) genoemd, behoort tot de familie van gamma-herpesvirussen (rhadinovirussen) en is geassocieerd met verschillende ziekten, zoals Kaposi's sarcoom, primair effusie-lymfoom (PEL) en multicentrisch Castleman-syndroom (MCD) (Wen et al., 2022). HHV8 speelt een belangrijke rol in de oncogenese van kanker bij deze ziekten (Jary et al., 2021). Het infecteert voornamelijk endotheelcellen, monocyt en B-cellen. Het latent nucleair antigeen (*LANA*) van HHV8 wordt vaak ingezet als biomarker in IHC testen (Pernick, 2013).

Het HHV8-virus heeft een dubbelstrengig desoxyribonucleïnezuur (DNA)-genoom en kan zowel een lytische als een latente infectiecyclus doorlopen. Tijdens de latente fase worden slechts een aantal genen, zoals *LANA-1*, *v-FLIP* en *v-cycline*, tot expressie gebracht. Deze eiwitten zijn belangrijk voor oncogenese doordat ze celproliferatie bevorderen, apoptose remmen en de immuunrespons helpen ontwijken (Jary et al., 2021). Door de virusontsnappingsmechanismen en de gebrekkige immuunrespons tegen HHV8, zoals beschreven door Ensoli et al. (2001), wordt de heractivering en verspreiding van het virus niet effectief beheerst door het immuunsysteem. In plaats van het virus te bestrijden, kunnen immuunresponsen die hierop gericht zijn, soms het reactieve proces verergeren. In de vroege stadia van Kaposi's sarcoom is de virale lading relatief laag, maar in latere stadia zijn bijna alle spoelcellen geïnfecteerd. Bij verminderde immuunfunctie kan het zich ontwikkelen tot een volwaardig sarcoom, waarschijnlijk door de langdurige aanwezigheid van HHV8-latentiegenen in

spoelcellen, wat leidt tot verstoringen in de expressie van oncogenen en tumorsuppressorgenen (Ensoli et al., 2001).

Een verhoogde expressie van HHV8 komt vaak voor bij homoseksuele mannen met het Acquired Immune Deficiency Syndroom (AIDS), maar ook bij oudere mediterrane mannen zonder AIDS (NCBI, z.d.). De heteroseksuele overdracht van HHV8 is niet consistent gedocumenteerd, en andere mogelijke transmissieroutes, zoals via bloedoverdracht, worden nog steeds onderzocht (Zavitsanou et al., 2010). Er bestaan echter nog steeds onzekerheden over de specifieke manieren waarop het virus zich verspreidt. Speeksel lijkt een belangrijke rol te spelen bij de virale transmissie, maar er is meer onderzoek nodig om de precieze transmissieroutes volledig te begrijpen (Jary et al., 2021).

Muis monoklonale primaire antilichamen tegen HHV8 worden gebruikt voor de detectie van het HHV8-eiwit in FFPE-weefsels. IHC kleuring is een zeer gevoelige en specifieke techniek die vaak wordt toegepast bij de diagnose van Kaposi's sarcoom (Siddiqui et al., 2023). Kaposi's sarcoom is een vasculair sarcoom dat aanzienlijke gezondheidsproblemen en sterfte kan veroorzaken, vooral wanneer het niet op tijd wordt behandeld. Het wordt vaak in verband gebracht met een infectie door HHV8. De IHC techniek is vooral nuttig wanneer de histopathologische kenmerken (zoals spleetachtige vaatruimten en spoelcellen) alleen niet voldoende zijn voor een definitieve diagnose. De uiteindelijke diagnose van Kaposi's sarcoom wordt vaak bevestigd door IHC, waarbij de aanwezigheid van HHV8 wordt aangetoond (Buhle et al., 2022).

Het monoklonale antilichaam tegen het HHV8 *LANA-1* is zowel specifiek als gevoelig voor de detectie van HHV8 in tumorcellen. Uit een studie bleek dat in alle 21 gevallen van Kaposi's sarcoom sterke nucleaire kleuring aanwezig was, terwijl geen van de monsters van niet-Kaposi's sarcoom gevallen positief waren (Patel et al., 2004). Dit benadrukt de betrouwbaarheid van het antilichaam als diagnostisch hulpmiddel.

Patel et al. (2004) toont aan dat een validatie van HHV8 antilichamen essentieel is voor een nauwkeurige en betrouwbare diagnose. In een studie uitgevoerd met een Ventana immunostainer (Roche) werd het HHV8 *LANA-1* antilichaam toegepast op vaste, paraffine-ingebbede weefselsecties, waarbij een gevoeligheid en specificiteit van 100% werd bereikt voor Kaposi's sarcoom. Antilichamen die Advanced Verification-gegevens bevatten, zijn gevalideerd op hun specificiteit om te garanderen dat deze binden aan het aangegeven antigeen (ThermoFisher, z.d.). HHV8 immunokleuring is een

krachtige diagnostische methode, vooral wanneer klinische kenmerken de voorkeur geven aan KS, maar de histologische morfologie andere vaatvormende letsels nabootst (Siddiqui et al., 2023).

5.4 BAP1 als diagnostisch en prognostisch hulpmiddel in tumordiagnostiek

Een ander voorbeeld van antilichaamvalidatie is de detectie van BAP1, een nucleair deubiquitinerend enzym dat fungeert als een tumoronderdrukkend gen en zich bevindt op chromosoom 3p21.1 (Stålhammar, 2020). BAP1 speelt een belangrijke rol in verschillende cellulaire processen, zoals DNA-schadeherstel, regulatie van de celcyclus, apoptose en chromatine-remodellering. Het verlies van BAP1-expressie wordt in verband gebracht met een slechtere prognose bij verschillende kankersoorten, waaronder uveaal melanoom, mesothelioom en heldercellig niercelcarcinoom (Stålhammar, 2020). BAP1 kan in kankercellen zowel functioneren als een tumorsuppressor als een metastasesuppressor. Het gebruik van IHC om BAP1 te analyseren in naaldbiopten kan waardevol zijn voor het inschatten van het risico voorafgaand aan een operatie en het afstemmen van de behandelingsstrategie (Bio SB, z.d.).

BAP1-IHC wordt vaak gebruikt als diagnostisch en prognostisch hulpmiddel. Het verlies van nucleaire BAP1-expressie is een betrouwbare indicator voor maligniteit in tumoren zoals mesothelioom en uveaal melanoom. Dit maakt BAP1 geschikt voor het onderscheiden van kwaadaardige laesies van goedaardige proliferaties, zoals reactieve mesotheliale proliferaties (Chapel et al., 2022). Een BAP1-mutatie is een belangrijke prognostische biomarker, waarbij het verlies van nucleaire expressie correleert met een lagere overlevingskans (Boffetta et al., 2019).

De immunohistochemische validatie van BAP1 omvat specifieke stappen om betrouwbare resultaten te verkrijgen. Secties van FFPE-weefsel ondergaan een antigenretrievalprocedure in Tris-EDTA-buffer (pH 9,0). Vervolgens wordt een monokonaal anti-BAP1-antilichaam toegepast, gevolgd door detectie met een DAB-chromogeen en tegenkleuring met hematoxyline (Cigognetti, 2015). Aanbevolen positieve controles volgens Stålhammar (2020) zijn onder andere pancreas, huid, de ganglionlaag van het netvlies, normale melanocyten of optische zenuwnuclei.

De beoordeling van BAP1-expressie richt zich voornamelijk op de nucleaire kleuring, waarbij tumoren worden geclassificeerd op basis van het percentage positieve tumornuclei. Tumoren met minder dan 33% nucleaire kleuring worden aangeduid als BAP1-laag, terwijl tumoren met 33% of meer nucleaire kleuring worden geclassificeerd als BAP1-hoog (Stålhammar, 2020). Deze methode is vooral effectief

bij uveaal melanoom, waarbij volledige afwezigheid (0%) of volledige retentie (100%) van BAP1-expressie het vaakst wordt waargenomen. Een gemengde expressie (1-99%) komt zelden voor (Stålhammar, 2020).

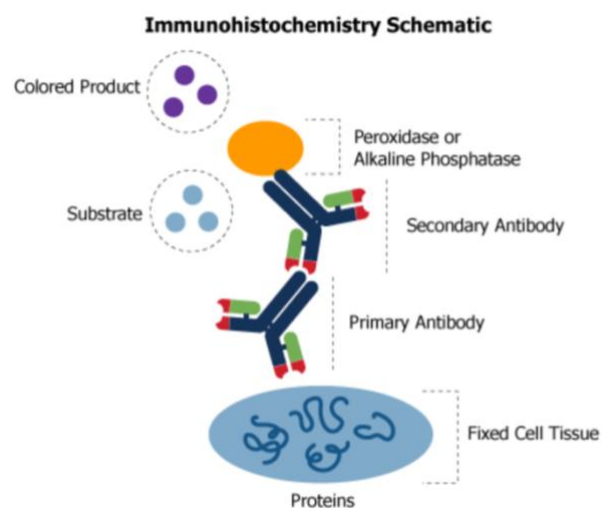
BAP1-IHC heeft een hoge specificiteit bij het identificeren van maligniteit, zelfs wanneer moleculaire technieken zoals next-generation sequencing (NGS) geen genetische veranderingen aantonen. Dit benadrukt het belang van IHC als diagnostisch hulpmiddel, vooral bij kleine biopsiemonsters (bijvoorbeeld punchbiopsies) waarin stromale invasie moeilijk te beoordelen is (Chapel et al., 2022). Er zijn wel enkele beperkingen volgens Cigognetti (2015), zoals variabiliteit in pre-analytische procedures, die de reproduceerbaarheid van de resultaten kunnen beïnvloeden. BAP1-negatieve tumorcellen waren echter gemakkelijk te identificeren, zelfs in gevallen van mesothelioom met variabiliteit in de tumorcellen, wat suggereert dat variabiliteit geen significante belemmering vormt voor de interpretatie van BAP1-expressie.

6 EXPERIMENTEEL DEEL

6.1 Algemene procedure IHC-kleuring

Voor de optimalisatie en validatie van de antilichamen HHV8 en BAP1 zal er een IHC-kleuring uitgevoerd worden op controlestalen en patiëntenstalen op de Dako Omnis (Agilent Technologies) toestellen. Binnen de IHC hebben volgens Taylor et al. in 2006 verschillende technologische innovaties geleid tot de ontwikkeling van gevoelige detectiesystemen. Eén van deze visualisatiesystemen maakt gebruik van het enzym HRP, dat in combinatie met een geschikt substraatsysteem zorgt voor de visualisatie van gelabelde antilichamen. Hierdoor kunnen deze met een lichtmicroscop worden waargenomen. Om weefselantigenen op te sporen via enzymatische labeling, wordt het weefsel eerst gedeparaffineerd, voorbehandeld en geïncubeerd met een primair antilichaam gevolgd door een peroxidase blocking stap. Vervolgens kan een secundair antilichaam (LINKER) indien nodig toegevoegd worden. Als laatste volgt dan het visualisatiesysteem of polymeer, afhankelijk van de gekozen detectiemethode. Het enzymatische label speelt een essentiële rol bij de detectie en visualisatie van het gevormde antigeen-antilichaamcomplex (Taylor et al., 2006).

In de volgende fase van het proces wordt een substraat toegevoegd aan het gelabelde antilichaam. Dit substraat reageert met het enzym en vormt een onoplosbaar, gekleurd neerslagproduct. Binnen de IHC wordt HRP vaak gebruikt als enzym, terwijl DAB een veelvoorkomend substraat is (Taylor et al., 2006). Dit enzym-substraatpaar wordt voor deze optimalisatie en validatie ook toegepast. De werking van de techniek wordt op Figuur 1 weergegeven.



Figuur 1. Weergave van het immunohistochemische (IHC) detectieprincipe (Rockland Immunochemicals, z.d.).

6.2 Werking Dako Omnis

Volgens Agilent Technologies (z.d.) is de Dako Omnis een geautomatiseerd systeem voor IHC en in situ hybridisatie (ISH), ontworpen om de efficiëntie in laboratoria te verhogen en de verwerkingstijd van patiëntcases te verkorten. Dankzij de continue case-verwerking en geautomatiseerde workflow kunnen laboratoria sneller resultaten verkrijgen, met een kortere doorlooptijd en minder handmatige handelingen.

De Agilent Technologies brochure (z.d.) geeft weer dat de IHC-kleuring van de Dako Omnis een gestroomlijnde aanpak biedt waarbij patiëntcases direct verwerkt kunnen worden, zonder de noodzaak van batchverwerking. Dit verlaagt de kans op menselijke fouten en zorgt ervoor dat pathologen sneller over correct gekleurde weefselcoupes beschikken voor diagnostiek. Het systeem is geoptimaliseerd voor gebruik met gevalideerde Agilent-protocollen en reagentia, wat de betrouwbaarheid van de kleuring verhoogt en het risico op fout-positieve of fout-negatieve resultaten minimaliseert.

Door de combinatie van automatisering, continue workflow en gevalideerde protocollen ondersteunt het Dako Omnis toestel laboratoria bij het verbeteren van hun efficiëntie en het verkrijgen van reproduceerbare en betrouwbare IHC-resultaten, wat essentieel is voor een snelle en nauwkeurige diagnose.

6.3 Materialen en methoden

Voorafgaand aan de optimalisatie en validatie van de antilichamen HHV8 en BAP1 was het noodzakelijk om geschikte weefselstalen te selecteren. Het type stalen werd bepaald aan de hand van een literatuurstudie en informatie van de websites van NordiQC en Pathology Outlines. Het minimale aantal te testen stalen per antilichaam werd vastgesteld volgens de praktijkrichtlijnen van Sciensano (Verbeke, 2022). Voor dit onderzoek betekende dit dat per antilichaam twintig stalen werden gebruikt, waarvan tien positief en tien negatief (Verbeke, 2022).

Voor HHV8 waren positieve stalen afkomstig van patiënten met Kaposi's sarcoom, PEL en MCD geschikt (Pernick, 2013). Negatieve stalen omvatten die van patiënten met merkelcelcarcinoom (Hong et al., 2003), angiosarcoom, dermatofibroom en pyogeen granuloom (Cheuk et al., 2004). Omdat het ZOL geen controleweefsel beschikbaar had (Figuur S1), werd een patiëntenstaal met Kaposi's sarcoom gebruikt. Kaposi's sarcoom is een aandoening die sterk geassocieerd wordt met HHV8-infectie, daarom werd specifiek dit patiëntenstaal uitgezocht. De geschikte positieve stalen voor BAP1 bestonden uit

epitheloïd mesothelioom, sarcomatoïd mesothelioom, longadenocarcinoom en maligne mesothelioom (epitheloïd en sarcomatoïd) (NordiQC, z.d.). De negatieve stalen waren uveaal melanoom, mesothelioom en weefsels met bekende lage of geen BAP1-expressie, zoals gedocumenteerd in studies van Stålhammar (2020). De mogelijke controleweefsels voor BAP1 (Figuur S1) waren appendix, tonsil en tuba (NordiQC, z.d.).

Alle nodige stalen voor beide antilichamen werden opgezocht in het archief en verzameld. Vervolgens werden de FFPE-weefselcoupes gesneden op een microtoom (Leica RM2255) met een dikte van 3,5 µm. De coupes werden gemonteerd op draagglaasjes (Dako Agilent) en op een strekplaat gelegd (1 minuut bij 45°C). Hierna werden de draagglaasjes gedurende 20 minuten bij 60°C in de oven geplaatst, wat zorgt voor een deparaffinatie en hechtingsverbetering van het weefsel aan het draagglaasje. Vervolgens werden alle draagglaasjes geladen op de Dako Omnis-toestellen, die de IHC-kleuring uitvoerden op basis van de vooraf geprogrammeerde protocollen.

Het HHV8*-protocol (Figuur S2) voor de IHC-kleuring op het Dako Omnis-toestel werd verkregen van het ziekenhuis Noorderhart (Pelt). In samenwerking met het ZOL bleef dit protocol in gebruik en was het eerder gevalideerd op een Dako Omnis-toestel in het laboratorium anatomo-pathologie van Noorderhart. De geautomatiseerde procedure op het Dako Omnis omvatte de deparaffinisatie van de weefselcoupes, warmte-geïnduceerde epitooptretrieval (HIER), immunohistochemische kleuring en een tegenkleuring van de weefselcoupes. Er werd gebruik gemaakt van de EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis) kit, de kit bevat reagens voor 600 testen. De antilichamen HHV8 en BAP1 werden aangekocht bij Cell Marque en geleverd door Sanbio, een erkende leverancier van laboratoriumreagentia. De voorbehandelingsprocedure en het kleuringsprotocol waren afhankelijk van het gebruikte antilichaam.

De voorbehandeling van de weefselcoupes begon met de deparaffinisatie, waarbij een clearing-agent (Dako Agilent) werd gebruikt, gevolgd door rehydratatie met gedemineraliseerd water. Vervolgens werd een epitooptretrieval uitgevoerd met EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (High pH, Tris EDTA buffer pH 9) via de HIER-methode bij 97°C gedurende 30 minuten. Vervolgens werden de draagglaasjes verplaatst van de voorbehandelingsmodule naar een verwarmde kleurmodule bij 32°C.

Voor de eigenlijke IHC-kleuring detecteerde het Dako Omnis-toestel het primaire HHV8 muisantilichaam (HHV8 Cell Marque ready-to-use). Daarna volgde een enzymatische blokkering met EnVision™ FLEX Peroxidase Blocking Reagent om endogene peroxidaseactiviteit te neutraliseren. Voor

een signaalversterking van vier tot vijfmaal werd een secundair antilichaam, de Mouse LINKER (EnVision™ FLEX), toegepast. De reactie werd vervolgens gevisualiseerd met DAB+ Chromogeen (HRP en substraat werkoplossing van EnVision™ FLEX). Als tegenkleuring werd hematoxyline (Dako Omnis) gebruikt, wat resulteerde in een heldere blauwe, nucleaire kleuring. De tegenkleuring werd gevolgd door een wasbuffer (Dako Omnis). De EnVision™ FLEX-reagentia waren specifiek ontworpen voor gebruik op FFPE-weefselcoupes.

Voor de optimalisatie van BAP1 werden twee verschillende protocollen uitgevoerd voor de IHC-kleuring (Figuur S4 en S5). Net als bij HHV8 werd het protocol BAP1* verkregen van het ziekenhuis Noorderhart. Het protocol BAP1 27'30" AL/HRP* was een reeds geoptimaliseerd protocol van het ZOL zelf.

De algemene procedure en principes van de protocollen waren identiek aan die van HHV8, met als enige verschil het gebruikte primaire antilichaam, in dit geval BAP1-muisantilichaam (BAP1 Cell Marque ready-to-use). Het onderscheid tussen beide BAP1-protocollen lag in de incubatietijd van het primaire antilichaam en het gelabelde polymeer (DAB+ Chromogeen). Voor protocol BAP1* bedroeg de incubatietijd van het primaire antilichaam 27 minuten en die van het gelabelde polymeer 20 minuten. Voor het geoptimaliseerde protocol BAP1 27'30" AL/HRP* was dit 27 minuten en 30 seconden voor beide. Door beide protocollen te vergelijken, werd bepaald welk protocol het meest geschikt was voor de detectie van BAP1-expressie tijdens de validatie.

Vervolgens werden de gekleurde IHC-draagglasjes ontwatert en afgedekt met dekglasjes in de HistoCore Spectra (Leica). De gekleurde weefselcoupes werden vervolgens microscopisch onderzocht door de pathologen met behulp van een lichtmicroscop (Leica DM 2000). De volgende aspecten werden geëvalueerd: sensitiviteit (aankleuring van hoog- en laagpositieve beoogde cellen), specificiteit (aankleuring in negatieve beoogde cellen), kleurintensiteit, uniformiteit, tegenkleuring, achtergrondkleuring en de aanwezigheid van bacteriële kolonies (Figuur S6).

6.4 Resultaten

Op basis van de kwaliteit van de weefselcoupes beoordelen pathologen verschillende aspecten met scores. De totaalscore bepaalt of de optimalisatie en validatie binnen het aanvaardbaarheids criterium vallen. De microscopische beelden van de stalen werden gegenereerd met behulp van de Pannoramic 250-scanner (3DHISTECH).

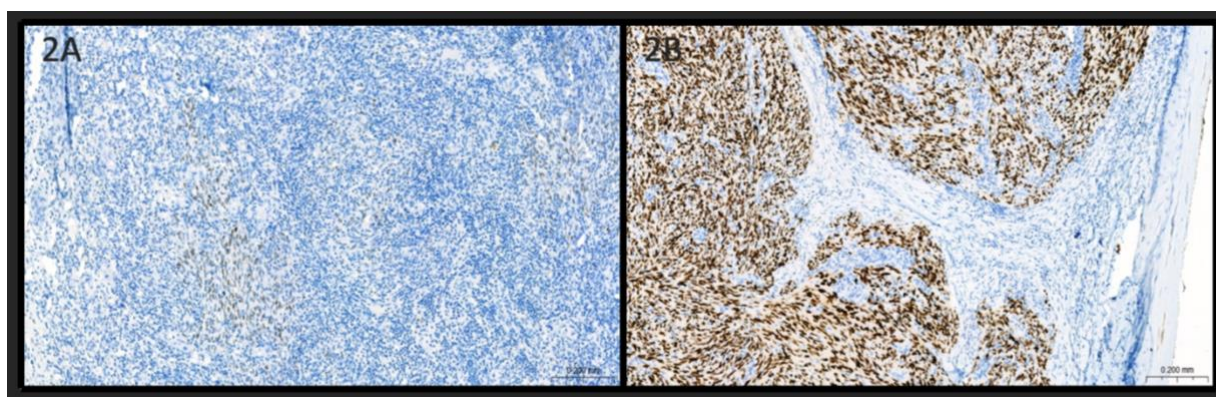
6.4.1 Optimalisatie HHV8

De HHV8-optimalisatie van het staal op Figuur 2A vertoont bijna geen nucleaire donkerbruine kleur, maar voornamelijk de blauwe tegenkleuring. De bruine kleur verwijst naar celkernen die positief zijn voor HHV8, terwijl de blauwe kleur duidt op negatieve celkernen. Het staal reageerde dus niet duidelijk positief. Op het resultatenblad, ingevuld door de patholoog, werd om die reden geen score toegekend aan dit staal (Figuur S6).

Het HHV8*-protocol (Figuur S2) van het laboratorium anatomo-pathologie van Noorderhart werd daarom aangepast (Figuur S3). De incubatietijd van 20 minuten voor het primaire antilichaam en 20 minuten voor het gelabelde polymeer werd gewijzigd naar 27 minuten en 30 seconden voor beide stappen. De incubatietijd werd verlengd, aangezien een te korte incubatietijd met het antilichaam kan leiden tot een zwak signaal.

De optimalisatie werd vervolgens opnieuw uitgevoerd met het aangepaste protocol (HHV8 27'30" AL/HRP*) en met een ander controleblok, namelijk een patiëntenstaal (24H12215 1.2) afkomstig van een huidexcisie van de voetrand met nodulair Kaposi sarcoom. Dit staal reageerde diffuus positief over het hele weefsel, met veel donkerbruine kernen zichtbaar in Figuur 2B. Er is een duidelijk contrast te zien tussen de positief bruine kernen en de negatief blauwe kernen. De positieve kernen behoren tot spoelvormige cellen, die kenmerkend zijn voor Kaposi sarcoom. Aan de rechterzijde van het beeld is de dunne epidermale huidlaag zichtbaar, terwijl de linkerzijde de onderliggende dermis toont.

De optimalisatie werd door de patholoog geëvalueerd en kreeg een maximale score van 11/11 op het resultatenblad (Figuur S7). De kleurintensiteit was duidelijk sterk en de blauwe tegenkleuring adequaat. Op basis van dit resultaat werd de optimalisatie als geslaagd beschouwd, en kon de validatie van HHV8 verder worden uitgevoerd.



Figuur 2. Microscopisch beeld van de IHC-kleuring voor HHV8 op huid linker voorarm met Kaposi sarcoma positief staal 22H13609 1-2 met het protocol HHV8 (2A) en huidexcisie voetrand met klassiek Kaposi sarcoma van het nodulair type positief staal 24H12215 met het protocol HHV8 27'30" AL/HRP* (2B). Beelden gescand met Pannoramic-250 (3DHISTECH) op vergroting 10X en schaal 0,200mm.*

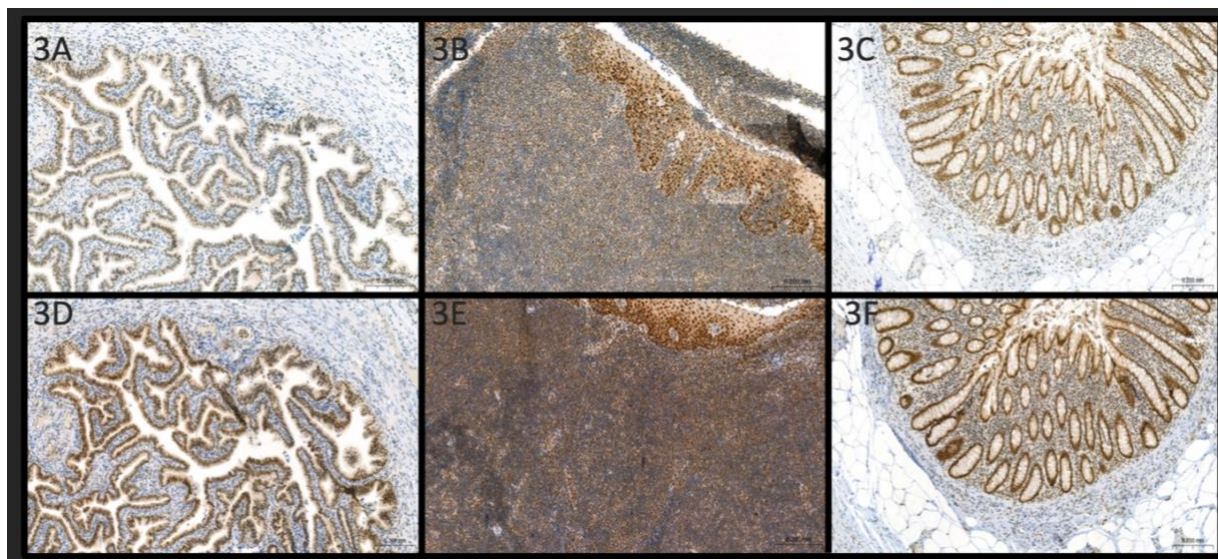
6.4.2 Optimalisatie BAP1

Bij de IHC-kleuring van BAP1 met het oorspronkelijke protocol (BAP1*) op tuba, tonsil en appendix (Figuur 3A-C) zijn alle drie de weefsels positief. Dit blijkt uit de duidelijke bruine kernkleuring van bepaalde cellen.

Bij gebruik van het alternatieve protocol (BAP1 27'30" AL/HRP*, Figuur S5) op hetzelfde controleblok (Figuur 3D-F) werd eveneens een positieve en duidelijke kleuring bekomen. De epitheelcellen in Figuur 3A en 3D, die de plooien van de tuba bekleden, kleuren bruin aan en zijn positief. De kleurintensiteit bij het protocol BAP1 27'30" AL/HRP* (Figuur 3D) is iets sterker dan bij het oorspronkelijke BAP1* protocol (Figuur 3A).

In de tonsil (Figuur 3B en 3E) is een mengsel van lymfoïd weefsel en epitheliale structuren te zien. De kleurintensiteit van de epitheelcellen is donkerder dan die van de bruin gekleurde lymfocyten. Ook hier is de kleurintensiteit bij het BAP1 27'30" AL/HRP* protocol (Figuur 3E) iets sterker dan bij BAP1* (Figuur 3B). In Figuur 3C en 3F, afkomstig van de mucosa van de appendix, zijn ovale slijmbekercellen zichtbaar in het epitheel. Tussen deze cellen liggen lymfocyten die lichter bruin aankleuren. De kleurintensiteit tussen beide protocollen verschilt hier ook licht.

De beide kleuringen werden als optimaal beoordeeld door de patholoog, met een maximale score van 11/11 (Figuur S9). Hierdoor werd voldaan aan het aanvaardbaarheids criterium en kon de validatie van BAP1 verdergezet worden.



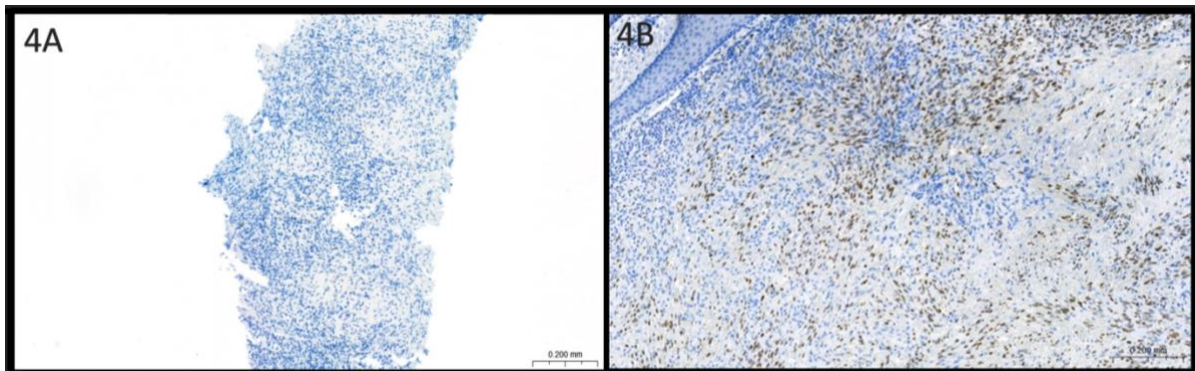
Figuur 3. Microscopisch beeld van de IHC-kleuring voor BAP1 met het protocol BAP1 voor 3A) Tuba, 3B) Tonsil, 3C) Appendix, alsook het protocol BAP1 27'30" AL/HRP* voor 3D) Tuba, 3E) Tonsil en 3F) Appendix. Beelden gescand met Pannoramic-250 (3DHISTECH) op vergroting 10X en schaal 0,200mm.*

6.4.3 Validatie HHV8

De validatie van HHV8 werd uitgevoerd met behulp van het protocol HHV8 27'30" AL/HRP*. In Figuur 4A wordt een negatief staal getoond, afkomstig van een lymfoom. Alle celkernen kleuren uniform blauw, zonder enige bruine aankleuring, wat duidt op een negatieve expressie voor HHV8. De tegenkleuring en achtergrond zijn duidelijk zichtbaar, wat de interpretatie van het resultaat ondersteunt. Dit staal behaalde een maximale score van 11 op 11. Ook de overige negen negatieve stalen (niet afgebeeld) behaalden scores van 10 of hoger, wat de betrouwbaarheid van de negatieve kleuring bevestigt (Figuur S8).

Figuur 4B toont een positief staal afkomstig van huidweefsel bij een Kaposi sarcoom. Hier is een korrelige, bruine nucleaire aankleuring zichtbaar in een deel van de cellen, voornamelijk spoelvormige cellen, wat wijst op een positieve expressie voor HHV8. De epidermis is zichtbaar linksboven in het beeld, met daaronder de dermis waar de positief aangekleurde kernen zich bevinden. De kleurintensiteit is matig en vertoont een beperkte uniformiteit, vooral de blauwe tegenkleuring is aan de linkerzijde intenser dan aan de rechterzijde. Dit staal behaalde een score van 9 op 11, hoofdzakelijk omwille van de matige intensiteit en ongelijkmatige aankleuring. De overige negen positieve stalen (niet afgebeeld) behaalden eveneens een score van 9 of hoger (Figuur S8). Volgens het vastgelegde

validatiecriterium wordt een score tussen 9 en 11 als aanvaardbaar beschouwd voor zowel positieve als negatieve stalen (zie Figuur S8).

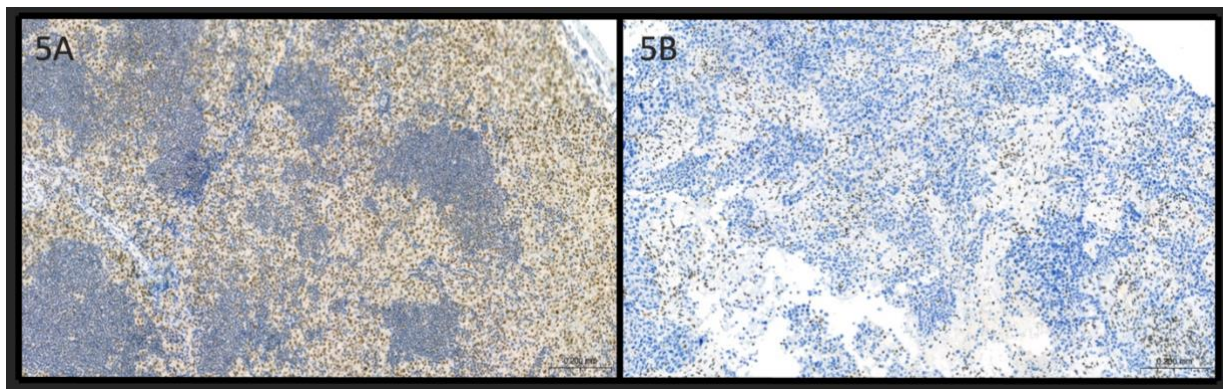


Figuur 4. Microscopisch beeld van de IHC-kleuring voor HHV8 met het protocol HHV8 27'30" AL/HRP op long punctie cilinder van grootcellig B-cel non-Hodgkin lymfoom negatief staal 24H17069 1.1 (4A) en huidexcisie enkel met Kaposi sarcoma positief staal 15H03482 1.1 (4B). Beelden gescand met Panoramic-250 (3DHISTECH) op vergroting 10X en schaal 0,200mm.*

6.4.4 Validatie BAP1

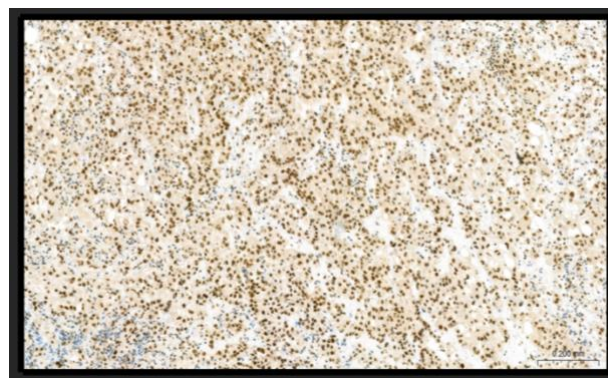
Voor de validatie van BAP1 werd het protocol BAP1* toegepast. In Figuur 5A wordt een lymfeklier met metastase getoond. Hoewel dit staal initieel geselecteerd werd als negatieve controle, vertonen de meeste celkernen een duidelijke bruine kleuring. Het staal is dus positief voor BAP1-expressie en bijgevolg ongeschikt als negatieve controle. Dit staal kreeg een score van 0/11, zoals aangegeven op het resultatenblad (Figuur S10), wegens de moeilijkheid in interpretatie en de twijfel over de geschiktheid van het weefsel.

Daarom werd de validatie herhaald met een ander controleblok (Figuur 5B). Dit staal bevat epitheloïd mesothelioomweefsel en toont verlies van BAP1-expressie, aangezien de tumorcellen geen of minimale bruine aankleuring vertonen. De stromale cellen kleuren wel matig tot sterk bruin, wat de kleuring ondersteunt. Dit staal kreeg een score van 11/11 op basis van de geanalyseerde criteria.



Figuur 5. Microscopisch beeld van de IHC-kleuring voor BAP1 met het protocol BAP1 op lymfeklieren met metastase van het gekende mesothelioom negatief staal 23H27066 1-1 (5A) en pleura met epitheloïd mesothelioom negatief staal 20H11794 1-1 (5B). Beelden gescand met Pannoramic-250 (3DHISTECH) op vergroting 10X en schaal 0,200mm.*

Verder werd het BAP1*-protocol toegepast op een positief staal afkomstig uit de pleura (Figuur 6). In dit staal kleuren vrijwel alle celkernen intens bruin, wat wijst op aanwezigheid van het BAP1-eiwit. Naast enkele blauwgekleurde celkernen werd het staal als positief beoordeeld, met een score van 11/11 (Figuur S10).



Figuur 6. Microscopisch beeld van de IHC-kleuring voor BAP1 met het protocol BAP1 op pleura met epitheloïd mesothelioom positief staal 23H19592 1-1. Beeld gescand met Pannoramic-250 (3DHISTECH) op vergroting 10X en schaal 0,200mm.*

De overige negen negatieve stalen (niet afgebeeld) kregen allemaal een score van 11/11 (Figuur S10). Eén bijkomend negatief staal (Figuur S10) werd geëvalueerd, maar kreeg een score van 0/11 omwille van onvoldoende kwaliteit en werd vervolgens uitgesloten. Aangezien er tien negatieve controles vereist zijn, werd dit niet herhaald.

De overige negen positieve stalen (niet afgebeeld) kregen allemaal een score van minimaal 9/11. Figuur S11 maakt deel uit van deze reeks positieve stalen.

Het aanvaardbaarheids criterium voor de validatie van BAP1 werd bereikt. De uiteindelijke score tussen 9 en 11 voor zowel de negatieve als positieve stalen wordt als optimaal beschouwd (Figuur S10).

6.5 Discussie

Dit onderzoek had als doel een optimaal immunohistochemisch kleuringprotocol te ontwikkelen, te optimaliseren en te valideren voor de antilichamen HHV8 en BAP1 op het Dako Omnis-toestel, met het oog op een betrouwbare toepassing op patiëntenstalen. Door middel van een systematische aanpak, bestaande uit literatuuronderzoek, experimentele optimalisatie en validatieprocedures, werd een protocol opgesteld dat zowel reproduceerbare als specifieke kleuringen opleverde. De optimalisatie en validatie van antilichamen is een langdurig en complex proces dat veel tijd en kosten met zich meebrengt. Het is ook een complex proces waarbij niet zomaar de bijsluiter van een antilichaam van een firma overgenomen kan worden.

De DAB bevattende substraat werkoplossing geeft een bruine kleur op de plaats van het doelantigeen dat wordt herkend door de primaire antilichamen. De tegenkleuring is blauw zodat er een duidelijk contrast is met het antigen-antilichaam complex dat bruin gekleurd is. De bruine kleur moet aanwezig zijn op het positieve controlespecimen op de verwachte locatie van het doelantigeen. Als er niet-specifieke kleuring aanwezig is, zal dit herkenbaar zijn als een eerder diffuse, bruine kleuring op de coupes die behandeld zijn met het negatieve controle reagens. Bij een suboptimaal protocol kan ook vuil zichtbaar zijn, wat eveneens ook te zien valt bij een positief staal. Dit wordt veroorzaakt door een opstapeling van DAB-residuen indien er niet goed gespoeld wordt. De celkernen worden blauw gekleurd door de hematoxyline tegenkleuring (Agilent Technologies, 2023). Volgens NordiQC (z.d.) zouden optimale resultaten kunnen behaald worden op het volledig geautomatiseerd kleuringsplatform Dako Omnis.

6.5.1 Optimalisatie HHV8

De eerste HHV8-kleuring (22H13609 1-2) met het oorspronkelijke protocol gaf geen duidelijk positief resultaat op het controleblok (Figuur 2A). Aangezien toch enkele bruin gekleurde kernen waarneembaar waren, lag het probleem vermoedelijk eerder bij het weefsel dan bij het protocol zelf. Om zeker te zijn werden zowel het gebruikte weefsel als het protocol aangepast. Dit leidde tot een duidelijk positief resultaat (Figuur 2B).

Volgens Agilent Technologies (2023) moet elke kleuring een bekend positief controlespecimen bevatten om de correcte werking van de gebruikte reagentia te garanderen. Indien het positieve controlespecimen geen kleuring vertoont, wordt de test als ongeldig beschouwd. Daarnaast moet ook een negatief controle reagens gebruikt worden om niet-specifieke kleuring te kunnen onderscheiden. Als niet-specifieke kleuring niet te onderscheiden is van specifieke kleuring, wordt de test ook als

ongeldig beschouwd. Door over te schakelen naar een patiëntenstaal met een bewezen Kaposi sarcoom, kon een geldig positief resultaat bekomen worden, zoals zichtbaar op Figuur 2B.

De duidelijke aankleuring van de spoelcellen in de dermis op Figuur 2B sluit aan bij wat uit de literatuur bekend is over Kaposi sarcoom. Deze tumor ontstaat uit endotheelcellen, die zich aan de binnenzijde van bloedvaten bevinden (Ensoli et al., 1999). Bij Kaposi sarcoom ondergaan deze endotheelcellen transformatie tot spoelvormige cellen als gevolg van infectie met HHV8 (Gessain & Duprez, 2005). Deze spoelcellen vormen abnormale vaatstructuren in de dermis (Keller & Purgina, 2023), wat verklaart waarom vooral de endotheelafgeleide cellen positief kleuren met de HHV8-kleuring. De aanwezigheid van spoelcellen en de diffuse aankleuring bevestigen dan ook de geschiktheid van het gebruikte patiëntenstaal als positieve controle.

De optimalisatie kreeg een maximale score van 11/11 op het resultatenblad (Figuur S7) en werd dus goedgekeurd.

6.5.2 Optimalisatie BAP1

De optimalisatie van BAP1 op tubaweefsel (Figuur 3A en 3D) leverde in beide protocollen een duidelijke bruine aankleuring op van de epitheelcellen die de plooien bekleden. Dit is in overeenstemming met de literatuur waarin beschreven wordt dat BAP1 vaak tot expressie komt in epitheliale cellen (Gessain & Duprez, 2005). Hoewel de kleurintensiteit met het protocol 27'30" AL/HRP* iets sterker was, werden beide kleuringen als intens genoeg beoordeeld door de patholoog, wat resulteerde in een maximale score van 11/11.

Bij tonsilweefsel wordt verwacht dat lymfocyten een zwakke tot matige nucleaire kleuring vertonen, afhankelijk van hun locatie binnen de mantelzone of het kiemcentrum (NordiQC, z.d.). Dit patroon is zichtbaar in Figuur 3B en 3E, waarbij de schakering in kleurintensiteit, tussen de donkerder gekleurde epitheelcellen en de lichter gekleurde lymfocyten, duidelijk aanwezig is. Deze variatie in intensiteit ondersteunt de juistheid van de kleuring.

Ook bij het appendixweefsel (Figuur 3C en 3F) worden de verwachte aankleuringen waargenomen. Volgens NordiQC (z.d.) moeten epitheelcellen een matige nucleaire kleuring vertonen en stromale cellen, gladde spieren en lymfocyten ten minste een zwakke aankleuring. In beide figuren is deze schakering aanwezig, wat aangeeft dat het protocol correct uitgevoerd werd.

Beide protocollen met een maximale score van 11/11 gaven een specifiek aankleuringspatroon, met hoge sensitiviteit en specificiteit (Figuur S9). Hierdoor voldeed de optimalisatie aan de gestelde kwaliteitscriteria en werd de validatie van BAP1 verantwoord verdergezet.

6.5.3 Validatie HHV8

De resultaten van de HHV8-validatie tonen aan dat het gebruikte protocol betrouwbare en reproduceerbare resultaten oplevert voor zowel negatieve als positieve stalen. Alle negatieve stalen vertoonden de verwachte afwezigheid van bruine aankleuring, terwijl de positieve stalen een duidelijke, zij het deels variabele, nucleaire kleuring vertoonden in HHV8-geïnfecteerde cellen.

De beperkte uniformiteit en matige intensiteit van de bruine aankleuring in het positieve controle-staal kunnen worden toegeschreven aan verschillende factoren. Biologische variaties, zoals verschillen in celtype of weefselstructuur, kunnen invloed hebben op de expressie en toegankelijkheid van het HHV8-antigeen. Spoelvormige cellen binnen het Kaposi sarcoomweefsel kunnen bijvoorbeeld sterker aankleuren dan omliggende cellen. Daarnaast kunnen ook technische aspecten zoals fixatiekwaliteit, variabele antilichaampenetratie of ongelijke verdeling van reagentia tijdens het kleuringproces een rol spelen bij een niet-uniforme aankleuring (Ramos-Vara, 2005).

Ondanks deze variaties blijft een score van 9/11 binnen de aanvaardbare grens voor validatie, en de consistent hoge scores van de overige stalen benadrukken de betrouwbaarheid van het protocol. Deze resultaten zijn in lijn met eerdere literatuur waarin immunohistochemische detectie van HHV8 als een gevoelige en specifieke methode wordt beschreven voor de identificatie van HHV8 in Kaposi sarcoomweefsel (Dupin et al., 1999).

6.5.4 Validatie BAP1

Tijdens de validatie van BAP1 werd initieel een negatief staal geselecteerd (Figuur 5A), dat bij analyse toch positieve nucleaire aankleuring vertoonde. Het ging om een zeldzaam BAP1-positief mesothelioom, wat uitzonderlijk is aangezien mesothelioom doorgaans gepaard gaat met verlies van BAP1-expressie (Chapel et al., 2021). Dit toont aan dat de interpretatie van IHC-kleuring met BAP1 voorzichtig moet gebeuren. De IHC-techniek detecteert immers enkel de aanwezigheid van het eiwit, en geeft geen informatie over de functionele activiteit ervan. Bij een mutatie in het BAP1-gen kan het eiwit nog steeds worden geproduceerd, maar niet functioneel zijn.

Het negatieve staal werd vervangen door een ander weefsel met epitheloïd mesothelioom (Figuur 5B), dat duidelijk verlies van BAP1-expressie toonde en dus wel geschikt was voor validatie. Dit voorbeeld toont aan dat de kwaliteit en de aard van het weefsel cruciaal zijn voor een correcte evaluatie. De negatieve aankleuring van neoplastische cellen gecombineerd met positieve stromale cellen vormt een betrouwbaar resultaat.

Het positieve controle-staal (Figuur 6) toonde een sterke en homogene nucleaire aankleuring, wat een bewaarde expressie van het BAP1-eiwit aanduidt. Ook de overige positieve stalen bevestigden dit beeld met consistente scores.

Volgens NordiQC (z.d.) is BAP1-IHC een marker met relatief lage reproduceerbaarheid. Kleine wijzigingen in protocolparameters zoals incubatietijd kunnen een aanzienlijke invloed hebben op de kleurintensiteit. Deze gevoeligheid verklaart deels de observaties tijdens deze validatie en benadrukt het belang van standaardisatie en strikte kwaliteitscontrole in IHC-methodes.

Een correcte fixatie en verwerking van weefselmonsters is essentieel voor een betrouwbare IHC-kleuring. Onjuiste fixatie, blootstelling aan verkeerde temperaturen of contaminatie kan leiden tot artefacten, achtergrondkleuring of verlies van antigeenexpressie. Daarnaast kunnen onverwachte kleuringen in tumoren optreden door niet-immunologische binding of antigeenveranderingen in neoplastische cellen. Daarom moet de interpretatie van de resultaten altijd plaatsvinden in combinatie met morfologische en histologische studies en door een gekwalificeerde patholoog worden beoordeeld (Agilent Technologies, 2023).

6.6 Conclusie

De resultaten tonen aan dat de optimalisatie van de immunohistochemische kleuring sterk afhankelijk is van parameters zoals de keuze van het primaire antilichaam, de antigenretrieval-methode en de incubatietijd. De focus lag op het verkrijgen van een optimale nucleaire kleuring, waarbij een duidelijke en consistente detectie van de eiwitexpressie cruciaal was. Voor HHV8 werd vastgesteld dat het protocol HHV8 27'30" AL/HRP* de beste resultaten opleverde, terwijl voor BAP1 het geoptimaliseerde BAP1*-protocol een hoge sensitiviteit en specificiteit toonde. Beide protocollen kregen een positieve beoordeling, met totaalscores tussen 9 en 11, wat binnen de aanvaardbare grenzen voor diagnostische toepassing valt. De validatie bevestigde dat de protocollen betrouwbaar en reproduceerbaar zijn,

waardoor deze met vertrouwen kunnen worden ingezet in het laboratorium anatomo-pathologie van het ZOL.

Hoewel deze studie een gestandaardiseerd en geoptimaliseerd IHC-protocol heeft opgeleverd, blijven er enkele aandachtspunten voor verder onderzoek. Toekomstige studies kunnen zich richten op de interlaboratorium-reproduceerbaarheid van het protocol, de toepasbaarheid op verschillende weefseltypes en de invloed van pre-analytische variabelen zoals fixatietijd en weefselkwaliteit. Daarnaast kan een vergelijking met andere kleuringstechnieken, zoals multiplex-IHC of digitale pathologie, bijdragen aan een verdere verfijning en robuustere validatie van de protocollen.

Samenvattend toont dit onderzoek aan dat een optimaal IHC-kleuringprotocol voor HHV8 en BAP1 op het Dako Omnis-toestel gerealiseerd kan worden door een doordachte optimalisatie en validatie van de kleuringsefficiëntie. Dit draagt bij aan een verbeterde diagnostische betrouwbaarheid en biedt mogelijkheden voor verdere verfijning naarmate nieuwe inzichten en technologieën beschikbaar worden.

7 REFERENCES

Agilent Technologies. (z.d.). *Dako Omnis brochure*, Geraadpleegd op 21 februari 2025, https://www.agilent.com/cs/library/brochures/29070_dako_omnis_brochure.pdf

Agilent Technologies. (z.d.). *Dako Omnis*. Geraadpleegd op 21 februari 2025, <https://www.agilent.com/en/product/dako-omnis-solution-for-ihc-ish/dako-omnis/dako-omnis-75902>

Agilent Technologies. (2023). *Dako Omnis Basic User Guide* (Versie 24). Agilent Technologies.

Bio SB. (z.d.). *BAP1 (BSB-109), MMab*. Geraadpleegd op 26 januari 2025, <https://www.biosb.com/biosb-products/bap1-antibody-mmab-bsb-109/>

Boffetta, P., Righi, L., Ciocan, C., Pelucchi, C., La Vecchia, C., Romano, C., Papotti, M., & Pira, E. (2019). Validation of the diagnosis of mesothelioma and BAP1 protein expression in a cohort of asbestos textile workers from Northern Italy. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(11), 1844. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz217>

Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., & Rimm, D. (2010). Antibody validation. *BioTechniques*, 48(3), 197–209. <https://doi.org/10.2144/000113382>

Buhle, A. C., Phillips, M. A., Hijazi, Y. M., Wiid, M., & Grider, D. J. (2022). Kaposi sarcoma: What to do with a negative human herpesvirus 8 immunohistochemical stain?. *Journal of cutaneous pathology*, 49(5), 460–462. <https://doi.org/10.1111/cup.14180>

Chapel, D. B., Schulte, J. J., Husain, A. N., Krausz, T., & Dacic, S. (2021). The Diagnostic and Predictive Use of BAP1 in Malignant Mesothelioma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 145(3), 326–336. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0153-RA>

Chapel, D. B., Hornick, J. L., Barlow, J., Bueno, R., & Sholl, L. M. (2022). Clinical and molecular validation of BAP1, MTAP, P53, and Merlin immunohistochemistry in diagnosis of pleural mesothelioma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 35(10), 1383–1397. <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01081-z>

Cheuk, W., Wong, K. O., Wong, C. S., Dinkel, J. E., Ben-Dor, D., & Chan, J. K. (2004). Immunostaining for human herpesvirus 8 latent nuclear antigen-1 helps distinguish Kaposi sarcoma from its mimickers. *American journal of clinical pathology*, 121(3), 335–342. <https://doi.org/10.1309/B8TC-OLBV-H8XY-5MFV>

Cigognetti, M., Lonardi, S., Fisogni, S., Balzarini, P., Pellegrini, V., Tironi, A., Bercich, L., Bugatti, M., Rossi, G., Murer, B., Barbareschi, M., Giuliani, S., Cavazza, A., Marchetti, G., Vermi, W., & Facchetti, F. (2015). BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 28(8), 1043–1057. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.65>

Dupin, N., Diss, T. C., Kellam, P., Tulliez, M., Du, M. Q., Sicard, D., ... & Boshoff, C. (1999). Immunohistochemical detection of human herpesvirus 8 latent nuclear antigen 1 in Kaposi's sarcoma and in multicentric Castleman's disease. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 823–829. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65180-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65180-7)

Ensoli, B., Barillari, G., & Stürzl, M. (1999). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8): epidemiology, virology, and pathogenesis. *Journal of Clinical Virology*, 14(2), 119–135. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(99\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(99)00022-0)

Ensoli, B., Stürzl, M., & Monini, P. (2001). Reactivation and role of HHV-8 in Kaposi's sarcoma initiation. *Advances in cancer research*, 81, 161–200. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(01\)81005-8](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(01)81005-8)

Gessain, A., & Duprez, R. (2005). Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(12), 2457–2465. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.018>

Hong, A., Davies, S., & Lee, C. S. (2003). Immunohistochemical detection of the human herpes virus 8 (HHV8) latent nuclear antigen-1 in Kaposi's sarcoma. *Pathology*, 35(5), 448–450. <https://doi.org/10.1080/00313020310001602657>

Hussaini, H. M., Seo, B., & Rich, A. M. (2023). Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2588, 439–450. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2780-8_26

Jary, A., Veyri, M., Gothland, A., Leducq, V., Calvez, V., & Marcelin, A.-G. (2021). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, the Etiological Agent of All Epidemiological Forms of Kaposi's Sarcoma. *Cancers*, 13(24), 6208. <https://doi.org/10.3390/cancers13246208>

Keller, B. A., & Purgina, B. (2023, mei 27). *Kaposi-sarcom*. MyPathologyReport.ca. Geraadpleegd op 21 maart 2025, <https://www.mypathologyreport.ca/nl/diagnosis-library/kaposi-sarcoma/#:~:text=Wat%20is%20Kaposi%2Dsarcom%3F,meer%20dan%20één%20tumor%20heeft>

Leong A. S. (2004). Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/00129039-200403000-00001>

My Pathology Report. (2023, oktober 23). *Spindelcellen*. MyPathologyReport.ca. Geraadpleegd op 21 maart 2025, <https://www.mypathologyreport.ca/nl/pathology-dictionary/spindle-cells/>

National Center for Biotechnology Information. (z.d.). *Human Herpesvirus 8 (HHV-8)*. In Bookshelf. Geraadpleegd op 21 maart 2025, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556023/>

NordiQC (z.d.). *BAP1*. NordiQC. Geraadpleegd op 5 februari 2025, <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=116>

Patel, R. M., Goldblum, J. R., & Hsi, E. D. (2004). Immunohistochemical detection of human herpes virus-8 latent nuclear antigen-1 is useful in the diagnosis of Kaposi sarcoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(4), 456–460. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800061>

Pernick N. (2013). *HHV8/KSHV*. PathologyOutlines. Geraadpleegd op 28 januari 2025, <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainshhv8.html>

Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

Rao, S. S. (1972). Antigenicity. *Indian journal of ophthalmology*, 20(2), 42–44.

Rockland Immunochemicals. (z.d.). *Immunohistochemistry Technique*. Rockland Immunochemicals. Geraadpleegd op 15 februari 2025, <https://www.rockland.com/resources/immunohistochemistry-technique/>

Shi, S. R., Liu, C., & Taylor, C. R. (2007). Standardization of immunohistochemistry for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: From experiments to hypothesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 55(2), 105–109. <https://doi.org/10.1369/jhc.6P7080.2006>

Siddiqui, F., Al Ameer, M. A., Al-Khalaf, J., Al-Marzooq, Y., & Al Ameer, A. (2023). Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Staining: A Savior in Early Kaposi Sarcoma. *Cureus*, 15(3), e36486. <https://doi.org/10.7759/cureus.36486>

Stålhammar G. (2020). *BAP1*. PathologyOutlines. Geraadpleegd op 26 januari 2025, <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsbap1.html>

Taylor, C. R., Shi, S., Barr, N., & Wu, N. (2006). Chapter 1 - Techniques of immunohistochemistry: Principles, pitfalls, and standardization. In D. Dabbs (Ed.), *Diagnostic immunohistochemistry* (2nd ed., pp. 1–42). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06652-8.50007-7>

ThermoFisher. (z.d.). *HHV-8 Antibodies*. ThermoFisher. Geraadpleegd op 23 januari 2025, <https://www.thermofisher.com/antibody/primary/target/hhv-8>

Verbeke, H. (2022). *Praktijkrichtlijn voor het opzetten van een kwaliteitssysteem in de erkende laboratoria voor pathologische anatomie werkzaam binnen het kader van het Erkenningsbesluit*. Sciensano. <https://www.sciensano.be/en/biblio/praktijkrichtlijn-voor-het-opzetten-van-een-kwaliteitssysteem-de-erkende-laboratoria-voor-0>

Wen, K. W., Wang, L., Menke, J. R., & Damania, B. (2022). Cancers associated with human gammaherpesviruses. *The FEBS journal*, 289(24), 7631–7669. <https://doi.org/10.1111/febs.16206>

Zavitsanou, A., Malliori, M., Syrsa, V., Petrodaskalaki, M., Psychogiou, M., Rokka, C., Giannopoulos, A., Kalapothaki, V., Whitby, D., & Hatzakis, A. (2010). Seroepidemiology of human herpesvirus 8 (HHV-8)

infection in injecting drug users. *Epidemiology and Infection*, 138(3), 403–408.
<https://doi.org/10.1017/S0950268809990628>

Voor taalcorrectie en het herformuleren van bepaalde passages werd ChatGPT (GPT-4, OpenAI) gebruikt als hulpmiddel. De uiteindelijke inhoudelijke verantwoordelijkheid ligt volledig bij de auteur.

8 BIJLAGEN

Antilichaam	Antilichaam	Antilichaam	Antilichaam
Actine	Chromogranine	Inhibine	PSA
AFB	CK14	INI-1	PSAP
Alcian blue	CK19	Iron	Reticuline
ALK1	CK20	Jones	RCC
ALK1 long (D5F3)	CK34 BE12	Kappa	ROS1
Androgen (AR)	CK5/6	Ki-67	S-100
BAP1	CK7	Lambda	SOX-10
Bcl 2	CMV	LCA	SOX-11
Bcl 6	C-MYC	Mammaglobin	SOX-11
BER-EP4	Congo Red	Mart-1	STAT6
beta-catenine	Cycline	MITF	steiner II
beta-HCG	Desmine	MLH1	Synapthophysine
BRAF	DOG1	MSH2	TDT
CA125	E-cadherine	MSH6	Thyroglobuline
Calcitonine	Elastine	MUM1	Trichrome III blue
Caldesmon	EMA	Myogenin	TTF-1
Calretinine	ER	Myeloperoxidase	Vimentine
CD10	ERG	NF	VZV CO
CD1a	GASTRINE	P16	WT1
CD15	GATA3	P40	
CD117	GCDFP-15	P504S = D1	FITC C1q
CD138	GFAP	P53	FITC C3
CD20	Giemsa	P57	IgA FITC IgA
CD21	Glycophorine	P63	IgG FITC IgG
CD23	Glypican	Pan Keratine	IgM FITC IgM
CD3	GMSII	Pan TRK	
CD30	Gram	PAS	SISH HER2
CD31	GS	Pax5	EBV ISH
CD34	HBs	PAX-8	
CD4	Hepatocyte	PDL-1	D3 Ki67/Mart1
CD5	Her2/neu	PGR	D3 PPH3/Mart1
CD56	HHV8	PHH3	
CD68	HMB 45	PMS2	
CD68 PG-M1	HP	Podoplanin	
CD7	HPV	PLAP	
CD79a	HSV CO	PRAME	
CD8	IDH 1		
CD99			
CDX2			
CEA	specifieke controleblok		
	MB1: appendix, tonsil, tuba = G2		
	MB2: prostaat, schildklier, placenta		
	MB3: huid, hersenen		
	D3: tonsil, huid (MM)		
	geen controleweefsel beschikbaar		

Overzichtslijst controleblokken,
Versie 10,
44-87-TC

Pagina 1 van 1

Ziekenhuis Oost-Limburg
Dienst Pathologische Ontleedkunde

Figuur S1. Overzichtslijst controleblokken van antilichamen, opgesteld door de pathologen van het ZOL

Protocol - HHV8*

Version: 6/11/2024 14:26

Dewax					
Two phase dewax IHC					
Solvent	Transport fluid	Temperature	Incubation top	Incubation bottom	Cycles
Clearly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
Two phase dewax wash IHC					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	5 s	1			
Target retrieval					
Target retrieval IHC					
Reagent	Temperature	Incubation	Cooling fluid		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water		
Staining					
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2:40 min	2			
Primary antibody					
Reagent	Incubation				
HHV8 CM RTU	20 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Endogenous enzyme block					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Secondary reagent					

Printed 28/02/2025 15:59 by immuno

Page 1 of 3

Reagent	Incubation	
EnV FLEX+ Mouse LINKER	10 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Labeled polymer		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX/HRP	20 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Substrate chromogen		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Printed 28/02/2025 15:59 by immuno

Page 2 of 3

Counterstaining		
Counterstain		
Reagent	Incubation	
Hematoxylin	3 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Figuur S2. Geoptimaliseerd protocol (HHV8) voor HHV8 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent)*

ZOL Campus Sint-Jan
Synaps Park 1
3600 Genk

Protocol details

Agilent
Dako

Protocol - HHV8 27'30" AL/HRP*

Version: 8/01/2025 11:31

Dewax					
Two phase dewax IHC					
Solvent	Transport fluid	Temperature	Incubation top	Incubation bottom	Cycles
Clearly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
Two phase dewax wash IHC					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	5 s	1			
Target retrieval					
Target retrieval IHC					
Reagent	Temperature	Incubation	Cooling fluid		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water		
Staining					
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2:40 min	2			
Primary antibody					
Reagent	Incubation				
HHV8 CM RTU	27:30 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Endogenous enzyme block					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Secondary reagent					

Reagent	Incubation	
EnV FLEX+ Mouse LINKER	10 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Labeled polymer		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX/HRP	27:30 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Substrate chromogen		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Printed 3/02/2025 15:05 by immuno Page 2 of 3

Counterstaining		
Counterstain		
Reagent	Incubation	
Hematoxylin	3 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Figuur S3. Geoptimaliseerd protocol (27'30" AL/HRP) voor HHV8 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent)*

Protocol - BAP 1*

Version: 6/11/2024 14:35

Dewax					
Two phase dewax IHC					
Solvent	Transport fluid	Temperature	Incubation top	Incubation bottom	Cycles
Clearly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
Two phase dewax wash IHC					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	5 s	1			
Target retrieval					
Target retrieval IHC					
Reagent	Temperature	Incubation	Cooling fluid		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water		
Staining					
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2:40 min	2			
Primary antibody					
Reagent	Incubation				
BAP1 BioSB RTU	27 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Endogenous enzyme block					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Secondary reagent					

Printed 4/02/2025 9:51 by immuno

Page 1 of 3

Reagent	Incubation				
EnV FLEX+ Mouse LINKER	10 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Labeled polymer					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX/HRP	20 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	31 s	1			
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Substrate chromogen					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	31 s	1			
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			

Printed 4/02/2025 9:51 by immuno

Page 1 of 3

Reagent	Incubation	
EnV FLEX+ Mouse LINKER	10 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Labeled polymer		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX/HRP	20 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Substrate chromogen		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Printed 4/02/2025 9:51 by immuno

Page 2 of 3

Counterstaining		
Counterstain		
Reagent	Incubation	
Hematoxylin	3 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Figuur S4. Geoptimaliseerd protocol (BAP1) voor BAP1 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent)*

Protocol - BAP 1 27'30"AL/HRP*

Version: 13/12/2024 12:53

Dewax					
Two phase dewax IHC					
Solvent	Transport fluid	Temperature	Incubation top	Incubation bottom	Cycles
Clearly Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s	1 min	1
Two phase dewax wash IHC					
Reagent	Incubation	Cycles			
DI Water	5 s	1			
Target retrieval					
Target retrieval IHC					
Reagent	Temperature	Incubation	Cooling fluid		
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water		
Staining					
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2:40 min	2			
Primary antibody					
Reagent	Incubation				
BAP1 BioSB RTU	27:30 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Endogenous enzyme block					
Reagent	Incubation				
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min				
Wash					
Reagent	Incubation	Cycles			
Wash Buffer	2 min	10			
Secondary reagent					

Reagent	Incubation	
EnV FLEX+ Mouse LINKER	10 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Labeled polymer		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX/HRP	27:30 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Substrate chromogen		
Reagent	Incubation	
EnV FLEX Substrate Working Solution	5 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
DI Water	31 s	1
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Printed 3/02/2025 15:05 by immuno

Page 2 of 3

Counterstaining		
Counterstain		
Reagent	Incubation	
Hematoxylin	3 min	
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10
Wash		
Reagent	Incubation	Cycles
Wash Buffer	2 min	10

Printed 3/02/2025 15:05 by immuno

Page 3 of 3

Figuur S5. Geoptimaliseerd protocol (BAP1 27'30" AL/HRP) voor BAP1 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent)*

Staal	Sensitiviteit: aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Sensitiviteit: aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
Geen controleweefsel beschikbaar in ZOL. 22H13609-1-2 Positief Huid linker voorarm : Kaposi sarcoom. In toto. Positief Kleurt talrijke histiocyten in en rondom het fetsel	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)		

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

Figuur S6. Beoordeling optimalisatie van HHV8 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 19/12/2024

Staal	Sensitiviteit: aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Sensitiviteit: aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
Geen controleweefsel beschikbaar in ZOL. 24H12215 1.2 + Positief huidscisie voetrand: klassiek kaposi sarcoma nodulair type Positief Diffuus positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)		

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

Protocolnaam	AL RTU	AL conc	TRS	Linker	HRP	Chromogeen
HHV8 27'30" AL/HRP*		27'30"	High		27'30"	5'

Figuur S7. Beoordeling optimalisatie van HHV8 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 08/01/2025

Staal	Specificiteit: aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
Matrix FFPE										
15H11653 1.1 + Huid linker voetzool – Kaposi sarcoma Positief: Herpes virus 8 (HHV8) positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	11
15H03482 1.1 + Huidexcisie enkel – klassiek type Kaposi sarcoma; in toto verwijderd Positief: HHV8-kleuring vertoont een korrelige nucleaire aankleuring in een deel van de cellen	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	9
24H12215 1.2 + Huidexcisie voetrand – klassiek Kaposi sarcoma nodulair type Positief: diffuus positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	11
15H16744 1.1 + Huid links plantair – nodulair Kaposi sarcoma Positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	10
18H23852 1.1 + Huid – Kaposi sarcoma Positief: korrelige aankleuring	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	11
15H14494 1.1 + Mediale enkel links – recidief Kaposi sarcoma Positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	9
20H20705 1.1 + Huid laterale voetrand – Kaposi sarcoma Positief: diffuus nucleair positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	10
21H01788 1.2 + Huid rechter laterale voetrand – residueel Kaposi sarcoma Positief: nucleaire positiviteit	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	10
22H13609 1.2 + Huid linker voorarm – Kaposi sarcoma Positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	10
16H06277 1.1 + Huid rechter handrug – nodulaire vaat tumor, Kaposi tumor Positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	10
24H13090 2.1 – Punchexcisie pinks links – vaatletsel quid angiolymfoïde hyperplasie met eosinofiele Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	11
24H01527 1.1 – Huid rug – lobulaire capillair haemangioom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	m	11

23H24296 1.1 – Huidexcisie onderbeen rechts – angiokeratoom met ontstekingen en reactieve veranderingen Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
24H15915 1.1 – Huidexcisie linker bovenbeen – lymfangioom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
24H02907 1.2 – Lymfeklier met vervarende fibrose en klein epitheloide granuloompjes Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	10
23H26979 1.1 – Huidexcisie linker kuit) hemoclertisch dermatofibroom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
23H27353 1.3 – Huidexcisie onderrug – pyogeen granuloom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
23H22193 1.1 – Huid excisie linker onderbeen – lobulair capillair hemangioom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
24H17069 1.1 – Long punctie cilinder – lokalisatie van een grootcellig B cel non Hodgkin lymfoom Negatief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaataat) 1 (adequaataat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	u	11
24H04067 1.1 – Extensorzijde linkerduim – lobulair capillair hemangioom/ granuloma pyogenicum Negatief									u	11

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

On

Figuur S8. Beoordeling validatie van HHV8 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 20/01/2025

Staal	Sensitiviteit: aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Sensitiviteit: aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
MB1 BAP1 *	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaar) 1 (adequaar)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
Appendix tuba tonsil										
MB1 BAP1 27'30"AL/HRP	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaar) 1 (adequaar)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
Appendix tuba tonsil										

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

Protocolnaam	AL RTU	AL conc	TRS	Linker	HRP	Chromogeen
BAP1*	27' RTU BioSB	/	High 30'	Mouse 10'	20'	5'
BAP1 27'30"AL/HRP	27'30" RTU BioSB	/	High 30'	Mouse 10'	27'30"	5'

Figuur S9. Beoordeling optimalisatie van BAP1 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 16/12/2024

Staal	Specificiteit: aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
Matrix FFPE										
23H13592 1-1 Positief pleura: epitheloid mesotheliom positief : bewaarde, nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
23H17866 1-9 Positief long: NSCLC adenocarcinoma positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
20H20820 1-1 Positief pleura: diffuus bifasisch maligne mesothelioma (epitheloid en sarcomatoid) Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
19H08009 1-1 Positief pleura: sarcomatoid mesotheliom Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
23H21951 1-1 Positief mesenterium: epitheloid mesothelioma Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
23H23520 1-1 Positief pleura: epitheloid mesothelioma Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11

expressie				3 (sterk)						
23H17896 1-10 Positief long: NSCLC niet kleincellig longcarcinooma: type adenocarcinoma positief	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
21H24307 1-5 Positief testis: sarcomatoid mesotheliom Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	9
pleura: bifasisch maligne mesotheliom met een sarcomatoid en epitheloide component Positief : bewaarde nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
20H16441 1-1 Negatief omentumbiopsie: epitheloid mesotheliom negatief : verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
23H27066 1-1 Negatief lymfeklieren: metastase van het gekende mesotheliom negatief : verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	9
21H00134 1-1 Negatief huid scalp rechts: klein restant van het elder gediagnosticeerd BAP1 inactiverd melanocytoma negatief : verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	0
22H15502 1-4 Negatief pleura: maligne mesotheliom epitheloid type negatief : verlies van	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaat) 1 (adequaat)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11

nucleaire expressie				3 (sterk)						
20H11734 1-1 Negatief peritoneum: epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
20M00917 1-1 Negatief pleura: epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
19H03685 2-1 Negatief huid: gecombineerde BAP1 geïnactiveerde naevus negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
20H11794 1-1 Negatief pleura: epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
20M00014 1-1 Negatief pleura: epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
22H24657 1-2 Negatief pleura: hooggradig epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11
18H03804 1-1 Negatief pleura: epitheloid mesothelioom negatief: verlies van nucleaire expressie	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

Protocolnaam	AL RTU	AL conc	TRS	Linker	HRP	Chromogeen
BAP1*	27'		High	Mouse 10'	20'	5'

2 Staten scoren slecht (m) in probleem kleuring
wel probleem weefsel
OK

Figuur S10. Beoordeling validatie van BAP1 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 24/12/2024

Staal	Specificiteit aankleuring 'high' positief beoogde cellen	Specificiteit aankleuring 'low' positief beoogde cellen	Specificiteit: aankleuring negatief beoogde cellen	Kleur- intensiteit	Uniformiteit	Tegenkleuring	Achtergrond- kleuring	Bacteriële kolonies	Initialen patholoog	TOTAAL SCORE
Matrix FFPE										
20H20837 1.1 + Huidexcisie li flank Naevus, atypie? <i>Positief: bewaarde nucleaire expressie in het grootste gedeelte van de grote cellen</i>	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (specifiek)	0 (geen) 1 (zwak) 2 (matig) 3 (sterk)	0 (geen) 1 (uniform)	0 (inadequaaf) 1 (adequaaf)	0 (sterk) 1 (matig) 2 (geen)	0 (aanwezig) 1 (afwezig)	FS	11

Behaalde score	Aanvaardbaarheids criterium
0-6	Onaanvaardbaar
7-8	Borderline
9-11	Optimaal

Conclusie:

Figuur S11. Beoordeling validatie van BAP1 IHC-kleuring op het Dako Omnis (Dako Agilent), uitgevoerd op 03/02/2025