

Cyklus: VIB2/17 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2017*, který je k dispozici na adrese www.sekk.cz v oddíle EHK. V tomto dokumentu naleznete informace, které se týkají jak tohoto konkrétního cyklu, tak EHK obecně. Kontakt na poskytovatele EHK a na koordinátora EHK naleznete na www.sekk.cz v oddíle O nás.

Vzorky

Byly použity vzorky (histologická skla se složenými tkáňovými bloky), které byly připraveny na pracovišti subdodavatele (MOÚ Brno).

Každý účastník obdržel 5 skel (označených A až E) a pro každé sklo bylo předepsáno barvení, které má účastník provést. Pro případ, že by některý účastník nemohl předepsané barvení provést, měli účastníci k dispozici ještě další markery, ze kterých mohli zvolit náhradu.

V případě, že by v průběhu barvení došlo ke znehodnocení většího počtu vzorků na skle (3 nebo více), mohli si účastníci vyžádat náhradní sklo – **proto je nutné, aby účastníci zpracování vzorků prováděli co nejdříve po jejich doručení** (abychom jim případné náhradní sklo stačili doručit před stop termínem cyklu).

Hodnocení výsledků účastníků

Úkolem pracovišť bylo:

1. Provést předepsané barvení standardním postupem, který je používán v rámci rutinního provozu laboratoře (případně provést některé z náhradních barvení a tuto informaci zapsat do průvodního listu).
2. Vyplnit dotazník v průvodním listu.
3. Zaslát nám zpět obarvená skla (vzorky EHK) spolu s vyplněným průvodním listem.

Hodnocení práce (kvality barvení) účastníků probíhá tak, že se sejde hodnotící tým složený ze 3 expertů. Tento tým hodnotí **kvalitu barvení** testovacích preparátů ve škále 0 až 2 body pro každé jednotlivé sklo takto:

- 0 ... barvení nevyhovuje
- 1 ... barvení je ještě přijatelné
- 2 ... barvení je vyhovující

Předem byly definovány podmínky pro hodnocení, tj. za co bude snižováno bodové ohodnocení. Jednalo se zejména o následující faktory:

Akceptovatelné: nízká úroveň očekávaného barvení, silné pozadí.

Nevyhovující: zcela negativní nebo velmi nízká úroveň barvení v očekávané lokalizaci, malý rozdíl mezi slabým signálem a vysokým přibarvením pozadí, prakticky neumožňující hodnocení.

Kvalita barvení konkrétního skla se nehodnotí, pokud:

- alespoň jeden expert označí sklo jako nehodnotitelné nebo
- provedl-li účastník jiné než předepsané nebo alternativní barvení.

Experté posuzují všechny vzorky anonymně, bez znalosti identifikace pracoviště, které vzorek zaslalo, i kitu, který byl pro vyšetření použit.

Složení týmu expertů

MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.
MUDr. Helena Hornychová, Ph.D.
MUDr. Iva Zambo, Ph.D.

Experté si na několika anonymních modelových případech společně otestovali svá měřítka pro hodnocení a prodiskutovali možné sporné body tak, aby zajistili maximální možnou shodu v interpretaci mezi jednotlivými experty. Bodová hodnocení pro jednotlivé vzorky se od jednotlivých expertů sčítala, součty tedy mohly dosáhnout 0 až 6 bodů pro každé testovací sklo (vzorek EHK). Dosažené sumy bodů byly následně hodnoceny takto:

Vzorek EHK
5 a 6 bodů ... výborný výsledek
3 a 4 body ... akceptovatelný výsledek
0 až 2 body ... nevyhovující výsledek

Akceptovatelný výsledek je znamením, že je třeba pokusit se výsledky barvení zlepšit. Nevyhovující výsledek je nutno považovat za varovný signál a impuls k okamžitému řešení.

Je-li výsledek účastníka na základě bodového hodnocení označen jako „výborný výsledek“ nebo „akceptovatelný výsledek“, je takový výsledek celkově v rámci EHK hodnocen jako **úspěšný**.

Způsob uspořádání tohoto cyklu je inspirován systémem a webovými stránkami NORDIQC, etablovaného evropského poskytovatele EHK pro imunohistochemii. Velmi doporučujeme při výběru primárních protilátek a optimálních protokolů prostudovat právě tyto stránky (www.nordiqc.org).

Hodnocení experty vychází z hodnotících kritérií NORDIQC, nicméně na základě některých ohlasů na výsledky minulých cyklů a po diskuzi ve výboru SČP bylo expertům doporučeno, aby své hodnocení poněkud „změkčili“ tak, aby nulový počet bodů dostávaly jen ty preparáty, které dle názoru experta nelze použít v rutinní praxi.

Cyklus: VIB2/17 – Všeobecná imunohistochemie - barvení**Komentář supervizora**

Tohoto cyklu se zúčastnilo 66 pracovišť, z nich 7 ze Slovenska. Tento počet laboratoří je velmi potěšující a ukazuje, že zapojení do EHK, které je ověřováno i při auditech laboratoří, je již vnímáno jako něco zcela samozřejmého.

Jako součást vyhodnocení tohoto cyklu naleznete na webu (www.sekk.cz) rovněž **edukační fotografie a virtuální skla**, která ukazují jak kvalitně provedená barvení, tak některé chyby, kterých se účastníci dopustili.

Výběr tkání pro EHK i vnitřní kontroly se řídí obecným pravidlem: správně fungující metoda dobře obarví i vzorky s nízkou úrovní exprese antigenu. Proto se do kontrol zařazují tkáně, kde je při dostatečně senzitivní metodě výsledek barvení slabý. V tomto cyklu je to např. slabá pozitivita p63 v placentě, slabá pozitivita ER v ojedinělých buňkách germinálních center lymfatických folikulů či slabá pozitivita aktinu v perisinusoidálních buňkách jater.

Výsledky tohoto cyklu byly velmi dobré, celková úspěšnost u všech skel byla vyšší než 90 %.

Vzhledem k relativně malému počtu účastníků není možno srovnávat primární protilátky ani použité protokoly (zde odkazujeme na zmiňované webové stránky NORDIQC), nicméně lze říci, že rozhodně není průkazný rozdíl v úspěšnosti mezi manuálním barvením a immunostainery.

Poznámky k jednotlivým předepsaným testům**Vzorek A**

ER (úspěšnost 100 %): potěšující je výrazné zlepšení oproti ložskému cyklu. Jako kontrolní materiál je mimo jiné vhodná tonzila, kde má být dosaženo slabé až střední positivity v části kryptálních epitelů a sporadických lymfoidních buňkách germinálních center.

Ki 67 (úspěšnost 77 %): neuspěla tři pracoviště pro velmi slabé barvení v tonzile (tonzila byla fixována 7 dní, optimálně naladěný protokol by ale tuto - v praxi relativně běžnou situaci s prefixovaným materiálem - měl zvládnout a barvení by mělo být silné).

Vzorek B

c-kit (úspěšnost 97 %): optimálním výsledkem by mělo být maximálně silné barvení v Cajalových buňkách, mastocytech a GISTu.

E-cadherin (úspěšnost 92 %): optimálním výsledkem by mělo být slabé membránové barvení hepatocytů.

Vzorek C

CK 7 (úspěšnost 100 %): vynikající výsledky prakticky všech účastníků, optimálním výsledkem by mělo být slabé až středně silné barvení interkalárních vývodů pankreatu.

CK AE1/AE3 (úspěšnost 90 %): neuspěla pouze jedna laboratoř pro výsledek, který barvil jen některé subpopulace epitelů – pravděpodobně jde o nedostatečný antigen retrieval. Optimálním výsledkem by mělo být slabé až středně silné zonálně uspořádané barvení hepatocytů při silné pozitivitě žlučovodů.

Vzorek D

p16 (úspěšnost 98 %): velmi dobrý výsledek u většiny pracovišť, neuspěla pouze jedna laboratoř. Optimálním výsledkem by mělo být slabé až středně silné barvení folikulárních dendritických buněk a fokální barvení kryptálního epitelu tonzily. Stejný výsledek by měl pravděpodobně být i v placentě (literárně nepodložené vlastní pozorování).

p63 (úspěšnost 100 %): optimálním výsledkem by mělo být slabé až středně silné barvení v některých buňkách cytotrofoblastu a ojedinělých lymfoidních buňkách v tonzile.

Vzorek E

Desmin (úspěšnost 96 %): neuspěla pouze dvě pracoviště, kde immunostainer poskytl zcela negativní výsledek. Optimálním výsledkem by mělo být silné barvení hladké svaloviny apendixu a slabé barvení cévních stěn.

SMA (úspěšnost 100 %): optimálním výsledkem by mělo být silné barvení hladké svaloviny a slabé až středně silné barvení perisinusoidálních buněk v játrech.

Reakce na připomínky účastníků

1) Připomínka: Netypické kontrolní vzorky s negativitou zkoumaných markerů.

Odpověď: Většina tkání obsahuje pozitivní struktury, některé tkáně slouží jako negativní kontrola.

2) Připomínka: Krátká doba stop termínu od doručení v době dovolených.

Odpověď: 9 dní po doručení je na provedení rutinní imunohistochemie opravdu dostatečná doba. I v době dovolených musí fungovat zastupitelnost pracovníků (ISO 15 189).

Cyklus: VIB2/17 – Všeobecná imunohistochemie - barvení**Dlouhodobá úspěšnost**

V následující tabulce je uveden přehled celkové úspěšnosti účastníků tohoto cyklu za poslední 2 roky. V záhlaví sloupců jsou uvedena jednotlivá pásma úspěšnosti (0 % ... nulová úspěšnost; 50 % ... úspěšnost 1 až 50 %; 75 % ... úspěšnost 51 až 75 % atd.). Na dalších 2 řádcích je pak absolutní a relativní počet účastníků, kteří příslušné úspěšnosti dosáhli.

Úspěšnost		0 %	50 %	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %	99 %	100 %
Počet	absolutní	0	0	2	5	5	10	24	0	20
	relativní	-	-	3 %	7,6 %	7,6 %	15 %	36 %	-	30 %

Poznámka: Svou vlastní celkovou úspěšnost za poslední 2 roky naleznete ve svém výsledkovém listu.

Třetina účastníků cyklu vykazuje za poslední 2 roky špičkovou (100%) úspěšnost.

Celková úspěšnost většiny účastníků tohoto cyklu je větší než 80 %.

Úspěšnost 80 % nebo nižší zaznamenalo jen 7 účastníků – tento stav by měl být vnímán jako impuls ke zlepšení.

Odborná supervize: MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
Brno
e-mail: fabian@mou.cz

Seznam všech supervizorů včetně kontaktů na ně je k dispozici na adrese www.sekk.cz v oddíle EHK.

Závěrečná zpráva s výjimkou příloh je veřejná (je zveřejněna jako součást souhrnného vyhodnocení cyklu na www.sekk.cz). Jednotlivé přílohy, označené kódem konkrétního účastníka EHK, jsou určeny pouze pro potřebu tohoto účastníka.

Přílohy

Jako přílohu této zprávy jednotliví účastníci cyklu dále dostávají:

Název přílohy	Poznámka
Osvědčení o účasti	Dostávají účastníci, kteří splnili podmínky pro jeho vystavení.
Výsledkový list (kvalitativní výsledky)	Dostávají účastníci, kteří uvedli kvalitativní výsledky. Ve výsledkovém listu naleznete bodové hodnocení barvení, které provedl tým expertů pro jednotlivá skla (symbolika je vysvětlena v legendě). Můžete zde porovnat své výsledky s anonymizovanými výsledky (počty bodů) ostatních účastníků. Na konci výsledkového listu každý účastník nalezne svou celkovou úspěšnost – tedy kolik procent výsledků zkoušek bylo očekávaných (správných) nebo alespoň akceptovatelných.
<i>Poznámky:</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Vysvětlení obsahu jednotlivých zpráv naleznete na adrese www.sekk.cz v oddíle EHK pod odkazem Zprávy pro účastníky EHK. • Souhrnný přehled výsledků této studie je k dispozici na adrese www.sekk.cz. 	

Přílohy jsou identifikovány svým názvem, označením studie a kódem účastníka.

Zároveň účastníkům vracíme všechna skla, která nám zaslali.