

Cyklus: IHC2/18 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2018*, 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

Vzorky (složené tkáňové bloky) pro tento cyklus byly připraveny na pracovišti subdodavatele. Zdrojové bloky byly vybrány z případů, které byly předem otestovány imunohistochemicky certifikovaným kitem (Ventana Pathway) a dále metodou SISH; vzorky do složeného bloku byly odebrány pouze z těch zdrojových bloků, kde byla shoda ve výsledku IHC a SISH (0 a 3+), ze vzorků 2+ byly vybrány případy s amplifikací genu (tj. splňující kritéria HER2 pozitivitu).

Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 44 laboratoří, z toho 10 ze Slovenska.

Složení týmu expertů pro tento cyklus	Prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D. MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. Prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
----------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------

Vzorky EHK

Naprostá většina účastníků vykazovala vynikající výsledky barvení vzorků, přičemž řada účastníků vykazuje výborné výsledky opakovaně.

Při **hodnocení barvení experty** dosáhlo 100% úspěšnosti celkem 42 laboratoří (tj. 95 % všech účastníků) (detaily viz níže). Dva účastníci dosáhli úspěšnosti 87 %. Lze tedy konstatovat, že podobně jako v minulých letech není v naprosté většině účastnických laboratoří zásadnější problém v analytické fázi testování.

Při **interpretaci vzorků účastníky** dosáhlo 100% úspěšnosti jen 30 účastníků (tj. 68 %), mezi 91 % a 99 % pak 4 účastníci, mezi 81 a 90 % bylo 7 účastníků a do kategorie 80 % nebo méně se dostaly 3 laboratoře.

Prakticky jsme se nesetkali s případy, kdy by laboratoř produkovala falešně pozitivní výsledky, tedy všechny negativní vzorky (0+) byly interpretovány správně jako negativní (zpravidla 0+, vzácně 1+, což však není nijak penalizováno při hodnocení úspěšnosti). Rovněž barvení silně pozitivních (3+) vzorků bylo u naprosté většiny účastníků zcela neproblematické a správně interpretované. Pokud by tedy složený blok rozeslaný v rámci tohoto cyklu obsahoval jen vzorky s těmito dvěma typy exprese, dopadli by všichni účastníci „na jedničku“.

Avšak celkem **6 z 15 vzorků bylo slabě pozitivních (2+)** a zde bylo možné pozorovat poměrně velké rozdíly mezi jednotlivými účastníky.

Problémové vzorky s expresí 2+

Podívejme se na skupinu vzorků s hraniční expresí 2+ (jednalo se o vzorky A1, A3, B2, C1, C3 a E2), kterých bylo 6 a hodnotilo je 44 účastníků. Ve 3 případech experti nehodnotili barvení, celkově jsme tedy měli 261 výsledků, u nichž bylo hodnocení exprese účastníkem nesprávné v 11 % případů. Lze pozorovat dobrou korelaci mezi kvalitou obarvení a pravděpodobností chyby v hodnocení.

Barvení bylo jako zcela nesprávné označeno experty jen u 3 vzorků (1 %). Celkem 242 (93 %) hodnocení barvení experty bylo v kategorii „vynikající“ (zisk 13 až 15 bodů) a 16 (6 %) se ocitlo v „akceptovatelné“ zóně (zisk 8 až 12 bodů).

Zatímco úspěšnost při interpretaci vzorků dobře obarvených (hodnocení experty 13 - 15 bodů) činila 92 %, u vzorků s hraniční kvalitou obarvení to bylo 63 % a u vzorků vyhodnocených experty jako nevyhovující nebyl výsledek interpretace správný ani v jednom případě (úspěšnost 0 %).

Jinými slovy – **i zdánlivě malá odchylka v kvalitě barvení** (tedy výsledek, který je experty označen jako ne optimální, ale ještě vyhovující) **vede častěji k nesprávné interpretaci**. A ta může mít pro pacientku zásadní dopad – po změně pravidel ze strany plátců se nádor s expresí 2+, která je ale interpretována jako 1+, nemusí dostat do referenční laboratoře a takovéto případy pak skončí jako falešně negativní a připraví danou nemocnou o možnost profitu z cílené anti-HER2 terapie.

Pokud budeme nahlížet výsledky hodnocení exprese a kvalitu barvení bodovanou experty jen "černobíle", tj. brát v úvahu pouze skutečnost, zda u daného vzorku účastník uspěl či neuspěl, jsou celkové výsledky velmi dobré - v hodnocení exprese byla průměrná úspěšnost 95 %, v hodnocení kvality barvení dokonce 99 %. Tomu odpovídá také **celková úspěšnost** (interpretace + bodování barvení vzorku EHK a VKK experty), kdy celkem **24 účastníků dosáhlo 100 %**, dalších 18 pak 90 % a více a pouze 2 laboratoře uspěly u méně než 90 % zkoušek.

U nezanedbatelné části účastníků však bylo možné pozorovat situaci, kdy:

- při hodnocení barvení experty uspěli u všech 15 vzorků (známkování od expertů bylo alespoň uspokojivé) - takových účastníků bylo 42 ze 44,
- avšak při za interpretaci (odečtení exprese vlastním účastníkem) tito účastníci – na rozdíl od barvení – neuspěli alespoň u 1 z 15 vzorků (takových bylo 12 ze 42).

Cyklus: IHC2/18 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Jinými slovy – u čtvrtiny laboratoří došlo k tomu, že barvení hodnocené přinejmenším jako „akceptovatelné“ ze strany expertů, vedlo k falešně negativní interpretaci vzorků s 2+ expresí.

Je nutné připomenout, že v případech, kde se jednalo o vzorky 2+ s potvrzenou amplifikací genu, **by tedy v reálné praxi u této chyby byla pacientka na základě falešně negativního výsledku nesprávně léčena.**

Metody detekce

Účastníci uvedli použití různých kitů takto:

Dako HercepTest	9
Dako c-erbB-2 Onkoprotein	11
Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu	22
Jiný	2

Přibližně 3/4 účastníků používají jeden z certifikovaných kitů - Dako HercepTest nebo Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu, další čtvrtina protilátka Dako c-erbB-2 Onkoprotein.

Díky dostatečnému počtu účastníků bylo možné provést obdobně jako v minulých cyklech i analýzu úspěšnosti dle použité metody (pro 3 nejčtenější).

Provedli jsme analýzu úspěšnosti u vzorků 2+ tak, abychom mohli posoudit rozdíly mezi metodami.

Při **interpretaci barvení účastníky** je procento nesprávně interpretovaných (neúspěšných) 2+ vzorků následující:

Dako HercepTest	25 %
Dako c-erbB-2 Onkoprotein	4,5 %
Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu	6,1 %

Podíl 2+ vzorků, u kterých byla **kvalita barvení hodnocena experty** jako vynikající / akceptovatelná / nevyhovující byl následující:

	vynikající (zisk 13 až 15 bodů)	hraničně vyhovující (zisk 8 až 12 bodů)	nevyhovující (zisk 0 až 7 bodů)
Dako HercepTest	88 %	8 %	4 %
Dako c-erbB-2 Onkoprotein	89 %	11 %	0 %
Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu	98 %	2 %	0 %

Při pohledu na tabulku se samozřejmě nabízí přímočará interpretace výsledků ve smyslu, že polyklonální protilátka použitá v rámci tzv. LDT (laboratory developed test) funguje vlastně lépe, než oba certifikované kity. To by bylo ovšem velmi zjednodušující. Spíše jsme zde svědky fenoménu, kdy polyklonální protilátka (se známou tendencí k přebarvování, tedy falešně silnějším výsledkům) nevedla k falešně negativním výsledkům u hraničních (2+) vzorků. Celková úspěšnost se u jednotlivých metod nijak nelišila a také experti se při hodnocení shodli, že případy, kdy byla použita detekce polyklonální protilátkou, byly často výrazně obtížněji interpretovatelné (cytoplazmatická pozitivita ztěžovala a vzácně i znemožňovala hodnocení membránové exprese).

Zároveň ovšem výsledky ukazují, že samotné použití certifikovaného kitu ještě nezaručuje automaticky správný výsledek, což je třeba mít na paměti při validaci metod v jednotlivých laboratořích, které se rozhodnout tyto kity využívat.

Komplexní pohled na výsledky

Opakovaně se vyskytujícím problémem jsou jisté technické nedostatky při zpracování vzorků. U hodnocených vzorků i u vlastních kontrolních preparátů (VKK) jsme občas zaznamenali výrazné známky zbytečně agresivního demaskování antigenu, těchto případů bylo ale méně než v minulých cyklech. U některých účastníků jsme také zaznamenali příliš intenzivní dobarvení hematoxylinem, a to někdy až v míře, která velmi výrazně komplikovala vyhodnocení exprese. Na technické problémy v kvalitě barvení (které nemusí nutně vyústit ve ztrátu bodů v EHK) jsou laboratoře, kterých se to týká, upozorněny formou individuálních komentářů (součást výsledkového listu). Věnujte jim laskavě pozornost, relativně snadná opatření mohou vést k zřetelnému zlepšení kvality barvení, a tím k usnadnění interpretace imunohistochemie.

Pro komplexní vyhodnocení toho, jak si laboratoř v EHK vedla, lze použít v podstatě 6 parametrů, z nichž žádný nelze interpretovat osamoceně, ale je třeba zvážit všechny dohromady. Jsou to:

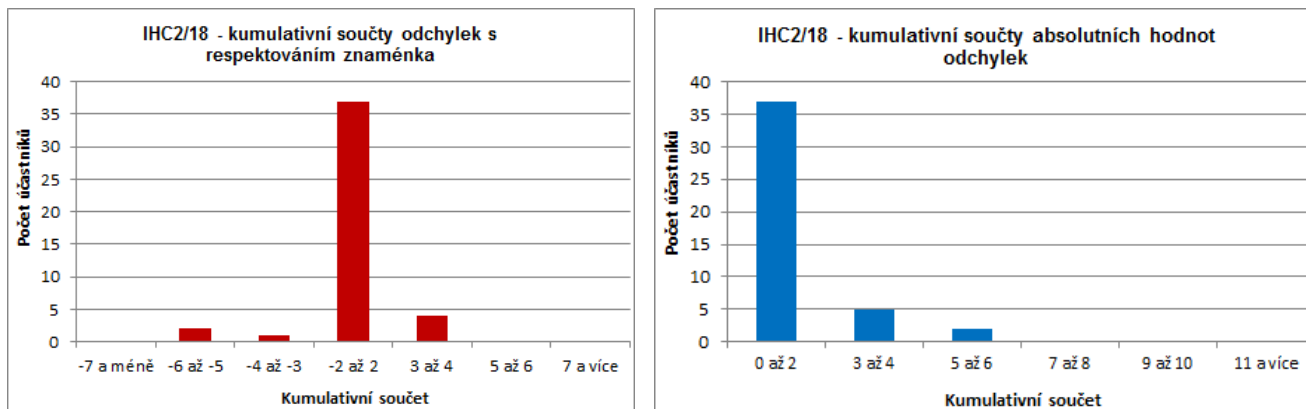
- 1) úspěšnost interpretace
- 2) úspěšnost barvení (hodnocení experty)
- 3) hodnocení vzorku VKK experty
- 4) celková úspěšnost v cyklu (zahrnuje 3 výše uvedené kategorie)
- 5) součty odchylek od vztažných hodnot – s respektováním znaménka i absolutních hodnot
- 6) případné připomínky expertů, které naleznete jako součást individuálního komentáře ve svém výsledkovém listu

Cyklus: IHC2/18 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Vlastní kumulativní součty odchylek (s respektováním znaménka i součty absolutních hodnot) nalezne každý účastník ve svém výsledkovém listu jako součást individuálního komentáře.

Jak je vidět v grafech níže, součet absolutních hodnot odchylek od vztažných hodnot dosáhl 5 a víc u 2 pracovišť, zatímco u 37 účastníků byl maximálně 2. **Tento výsledek považují experti za velmi dobrý. Doufáme, že alespoň obdobné či pokud možno ještě lepší výsledky uvidíme i v příštích cyklech!**

Abyste měli srovnání a mohli zjistit, zda se vaše kumulativní součty pohybují v oblasti průměru nebo zda nějakým způsobem vybočují, naleznete na následujících obrázcích histogramy těchto odchylek pro všechny účastníky cyklu:

**Vysvětlení pojmu „součty odchylek od vztažných hodnot“**

Pro každého účastníka se kumulativně sčítají odchylky od vztažných hodnot u jednotlivých vzorků (pouze u prvních 15 zkoušek, kde účastníci hodnotí expresi), a to jak s respektováním znaménka (odchylky směrem dolů se znaménkem mínus, odchylky směrem nahoru se znaménkem plus), tak v absolutní hodnotě. Rozdíl mezi hodnocením *negativní* (0) a *negativní* (1) je počítán jako nulový.

Příklad: laboratoř XY vyhodnotila vzorek E1 (který měl být hodnocen jako 3+) jako 0 a vzorek E3 (který měl být hodnocen jako 0) jako 2+. Součet odchylek s respektováním znaménka tedy je (-3) + (+2) = -1, a součet absolutních hodnot odchylek je 3+2 = 5.

Tento způsob hodnocení dokáže identifikovat laboratoře, které spíše nadhodnocují (součet odchylek s respektováním znaménka je kladný), spíše podhodnocují (součet odchylek s respektováním znaménka je záporný) i takové, které mají zcela nekonzistentní výsledky interpretace (a zpravidla i barvení) – součet odchylek s respektováním znaménka se blíží 0, avšak součet absolutních hodnot odchylek je 10 nebo více.

Vnitřní kontroly (VKK)

Jak bylo již opakovaně konstatováno, **pro identifikaci většiny problémů v detekci plně postačuje bazální analýza výsledků interní kontroly**, pokud je prováděna kontinuálně a kontrolní vzorky jsou správně vybrány – EHK tak problém v laboratoři jen potvrdí. Laboratoř může snadno odhalit špatnou kvalitu barvení daleko dříve, než po půl roce, kdy následuje další cyklus EHK.

Obecně jsme hodnotili kvalitu vlastních kontrol účastníků jako zřetelně horší, než tomu bylo u testovaných vzorků. Potěšující je jistě ústup od kontrol s jediným stupněm exprese (zpravidla pouze 3+) – s tím jsme se tentokrát setkali pouze u jediného účastníka – ke kontrolám pokrývajícím širší spektrum stupňů pozitivitu. Přesto jsme však při procházení preparátů od jednotlivých účastníků narazili na nemalé rozdíly.

Za jediné rozumně v rutinní praxi použitelné kontroly lze považovat ty, které jsou tvořeny vzorky s různou expresí na jednom sklíčku – jen obtížně si lze představit, že laboratoř v běžném provozu kvůli obarvení jednoho testovaného nádoru současně bude barvit další 3 nebo 4 preparáty s kontrolami různé intenzity, toto by bylo jen těžko ekonomicky únosné.

Avšak „pouhé“ složení tkáně z různých nádorů s různou intenzitou do jednoho bloku je podmínkou nutnou, nikoli však postačující. **Jako zcela nevyhovující je třeba označit užívání materiálu z core-cut biopsií.** Zde krájení do kontrol jednoznačně ohrožuje další využitelnost tkáně pro potřeby pacientky samotné.

Za optimální lze naopak považovat složení bloků z různých resekcí preparátů – zde je nutno dbát zejména na kvalitní fixaci, **setkali jsme se se vzorky těžce poškozenými autolýzou a ty jsou pro kontroly také naprosto nevhodné.** Jako možná nejjednodušší řešení se tak pro pracoviště s omezeným přístupem k dostatečnému počtu resektů nabízí využití komerčně nabízených kontrol, které poskytují velmi dobré a standardizované výsledky.

V některých případech byli experti vysloveně zaskočeni – laboratoř, která měla „soutěžní vzorky“ obarvené velmi pěkně (často bez ztráty jediného bodu) měla vlastní kontroly – mírně řečeno – na hranici přijatelnosti. Tkáně autolyzované, nevhodně zvolené (případy, kdy rozdíly mezi jednotlivými stupni exprese byly minimální), apod. Setkali jsme se dokonce s tím, že komerční kontrolní sklo se 3 vzorky, které má mít správně expresi 3+, 1+ a 0 bylo účastníkem zasláno s tím, že výsledek má být 3+, 0 a 0 (tedy tak jak to vyšlo, nikoli tak, jak to mělo být správně). Toto je samozřejmě zcela nepřijatelné.

Cyklus: IHC2/18 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Opakovaně proto doporučujeme, abyste věnovali opravdu **velkou pozornost svým vlastním kontrolám** (coby permanentnímu indikátoru kvality barvení). Pokud jsou vhodně zvoleny a správně využívány, dokáží napomoci s identifikací jakéhokoli problému v podstatě ihned, nikoli až po několika měsících při neúspěchu v EHK.

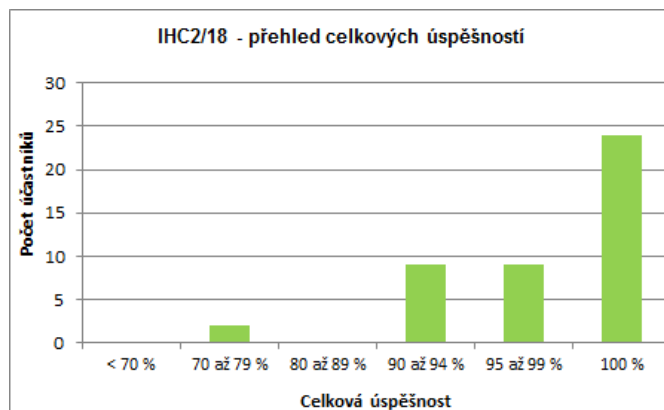
Formální nedostatky

Jeden účastník zapomněl v průvodním listu popsat svůj vzorek VKK. Jde o chronický problém daného účastníka, kterému na toto téma píšeme opakovaně individuální komentáře, na které nereaguje.

Závěr

Celkové úspěšnosti (zahrnující interpretaci vzorku EHK účastníkem, bodování barvení vzorku EHK experty a bodování vzorku VKK experty) jednotlivých účastníků ukazuje graf vpravo.

Každý účastník nalezne svou vlastní celkovou úspěšnost na konci svého výsledkového listu.



U ojedinělých účastníků, kteří neuspěli, je na místě přijetí adekvátních nápravných opatření v souladu s postupy správné laboratorní praxe.

Je třeba si ale uvědomit, že ani opakovaný úspěch v EHK není automatickou zárukou trvalé kvality práce laboratoře. Prosím proto tímto všechny účastníky, aby neusnuli na vavřínech a věnovali trvalou pozornost kontrole kvality v každodenním provozu. Problémy se vyskytovaly, vyskytují a budou vyskytovat ve všech laboratořích. Jde o to je identifikovat – a to pokud možno okamžitě po jejich vzniku – a přijmout taková nápravná opatření, aby byly chyby eliminovány. Jedině tak budeme schopni poskytovat trvale kvalitní výsledky a pomáhat tak nemocným s karcinomem prsu.

Prosíme, věnujte pozornost individuálním komentářům, které naleznete ve svých výsledkových listech.

Odborná supervize: Prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.
Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN
Fakultní nemocnice
500 05 Hradec Králové
e-mail: ryskaale@fnhk.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)	Na začátku jsou uvedeny kumulativní součty odchylek. Dále ve výsledkovém listu naleznete (symbolika je vysvětlena v legendě): a) Výsledky vlastní interpretace jednotlivých vzorků (to jsou zkoušky označené AI exprese HER-2/neu atd.). U každého vzorku je uvedeno i to, jak jej hodnotili ostatní účastníci. b) Bodové hodnocení barvení, které provedl tým expertů (to jsou zkoušky označené AI barvení vzorku atd.). I zde můžete provnat své výsledky s anonymizovanými výsledky (počty bodů) ostatních účastníků. c) Bodové hodnocení vlastního kontrolního preparátu (zkouška označená VKK = vnitřní kontrola kvality). Vzhledem k tomu, že typ použitých vnitřních kontrol se mezi jednotlivými laboratořemi liší, je pouze sumárně ohodnocena

Cyklus: IHC2/18 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

	kvalita barvení a její interpretace za kontrolu jako celek, nikoli za jednotlivé dílčí vzorky. Na konci výsledkového listu každý účastník nalezne svou celkovou úspěšnost – tedy kolik procent výsledků zkoušek bylo správných nebo alespoň akceptovatelných.
Souhrn výsledků - přehled	Zobrazuje souhrn vztažných hodnot, výsledků účastníka a bodů, které získal od expertů, ve formátu, který graficky odpovídá rozložení vzorků ve složeném tkáňovém bloku.
<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 tohoto cyklu je k dispozici na adrese www.sekk.cz.	

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

Zároveň účastníkům vracíme všechna skla, která nám zaslali.