

Cyklus: VIB1/18 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

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

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

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 informaci o barvení zapsat do průvodního listu.
2. Zaslat 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

Skla, která účastník obarvil jiným než předepsaným nebo náhradním barvením, nejsou experty hodnocena.

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. Jitka Kyclová
MUDr. Víta Žampachová

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: VIB1/18 – Všeobecná imunohistochemie - barvení**Komentář supervizora**

Tohoto cyklu se zúčastnilo 73 pracovišť, z nich 12 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 synaptofyzin v kůře nadledviny nebo GATA 3 v lymfocytech.

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**

PgR (úspěšnost 100 %): překvapivě skvělý výsledek u poprvé zařazeného markeru, potěšující je relativně malá variabilita v dosahované úrovni barvení mezi jednotlivými účastníky (jde o klinicky závažný marker, na jehož základě se rozhoduje o typu hormonální terapie karcinomu prsu). Jako kontrolní materiál je mimo jiné vhodný čípek, kde má být dosaženo silné positivity v bazální vrstvě ekto cervikálního epitelu. V tomto cyklu byly zařazeny dva karcinomy prsu se střední a silnou pozitivitou – účastníci, kteří slabě nebo vůbec nenabarvili epitel čípku, dosáhli také slabšího barvení v těchto karcinomech.

Ki 67 (úspěšnost 93 %): jako kontrolní materiál slouží tonzila nebo apendix – měla by být dosažena téměř 100% jaderná pozitivita v germinálních centrech.

Vzorek B

Synaptofyzin (úspěšnost 89 %): téměř všechny neúspěšné laboratoře, stejně jako ty, které dosáhly hodnocení „akceptovatelný výsledek“, se potýkají se slabým až falešně negativním barvením. Optimální kontrolní materiál je nadledvina – kůra je fokálně slabě až středně pozitivní, dřev je difúzně silně pozitivní. Ve tkáních použitých v tomto cyklu byl zařazen i NET s difúzní silnou pozitivitou a adenokarcinomu colon, jehož nádorové buňky jsou negativní.

Chromogranin (úspěšnost 100 %): Vhodný kontrolní materiál je apendix – silná pozitivita v endokrinních kryptálních buňkách a slabá až střední pozitivita v axonech a gangliových buňkách myenterického plexu.

Vzorek C

CD 34 (úspěšnost 95 %): optimálním kontrolním materiálem je jaterní parenchym – správným výsledkem by mělo být středně silné barvení periportálních sinusoid a silné barvení endotelu portálních cév. V tomto cyklu byl mj. zařazen vzorek dermatofibrosarcoma protuberans s ověřenou silnou pozitivitou.

CD 31 (úspěšnost 100 %): optimálním kontrolním materiálem je také jaterní parenchym – správným výsledkem by mělo být slabé až středně silné barvení všech sinusoidálních endotelií a samozřejmě silné barvení endotelu portálních cév.

Vzorek D

CK 20 (úspěšnost 100 %): vhodný kontrolní materiál je apendix – pozitivita má zahrnovat prakticky celý epitel s postupným slábnutím směrem od superficiálního epitelu až po bazi krypt. V tomto cyklu by zařazen vzorek karcinomu z Merkelových buněk s ověřenou silnou téměř difúzní tečkovitou paranukleární pozitivitou.

CK AE1/AE3 (úspěšnost 100 %): vhodný kontrolní materiál je jaterní parenchym - optimálním výsledkem by měla být silná pozitivita ve žlučovodech a mozaikovitá, slabá až střední, membránově akcentovaná pozitivita ve všech hepatocytech. Dále je vhodné zařadit i vrstevnatý dlaždicový epitel – slabší antigen retrieval vede k slabé pozitivitě v parabazálních vrstvách epitelu.

Vzorek E

Cyklin D1 (úspěšnost 96 %): krásný výsledek u poprvé zařazeného markeru, neuspěla pouze jedna laboratoř pro falešně negativní výsledky barvení. Optimální kontrolní materiál je např. dlaždicový epitel tonzily, výsledkem by mělo být silné barvení. Jako vnitřní kontrola ve všech tkáních se vždy znázorňují endotelie.

GATA3 (úspěšnost 87 %): jediná laboratoř neuspěla pro falešné positivity, většina účastníků s „akceptovatelným“ výsledkem by měla naopak barvení zesílit - časté jsou falešné negativity v lymfocytech. Vhodný kontrolní materiál je

Cyklus: VIB1/18 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

ledvina (silné pozitivita v epitelu tubulů) a tonzila (slabá až střední pozitivita v T lymfocytech). Všudypřítomné T lymfocyty také slouží jako výborná vnitřní kontrola prakticky ve všech tkáních.

CD 3 a CD 20 (úspěšnost 100 %): převážně velmi krásné výsledky, není třeba komentovat.

Reakce na poznámky účastníků

1) Poznámka účastníka: v jícnu nalezen susp. adenokarcinom.

Odpověď: ano, jde o tkáň odebranou pro účely EHK z makroskopicky nesuspektní oblasti mezi tumorem a resekcí linií, v prvních řezech byla bez nádorových změn, ke karcinomu jsme se postupně „dořezali“.

2) Poznámka účastníka: ve vzorku D namísto tonzily přítomen apendix.

Odpověď: ano, byla to chyba supervizora cyklu, který se tímto kaje, všem se omlouvá a současně děkuje za okamžité upozornění.

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.

<i>Úspěšnost</i>		<i>0 %</i>	<i>50 %</i>	<i>75 %</i>	<i>80 %</i>	<i>85 %</i>	<i>90 %</i>	<i>95 %</i>	<i>99 %</i>	<i>100 %</i>
Počet	absolutní	0	0	2	2	4	8	22	0	35
	relativní	-	-	2,7 %	2,7 %	5,5 %	11 %	30 %	-	48 %

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

Téměř polovina účastníků tohoto cyklu vykazuje za poslední 2 roky špičkovou (100%) úspěšnost.

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

Úspěšnost 80 % nebo nižší zaznamenali jen 4 (tj. 5,5 %) účastníci – 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:

<i>Název přílohy</i>	<i>Poznámka</i>
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.