

Cyklus: VIB2/18 – 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. 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

Skla, která účastník obarvil jiným než předepsaným nebo náhradním barvením, nebo barvení vůbec neuvedl, 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 některý expert označí sklo jako nehodnotitelné.

Expertí posuzují všechny vzorky anonymně, tj. bez znalosti pracoviště, které vzorek zaslalo.

Složení týmu expertů	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. MUDr. Petra Kašparová, Ph.D. MUDr. Iva Zambo, Ph.D.
-----------------------------	---

Expertí 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:

Počet bodů	Hodnocení	Doporučení
6 nebo 5	výborný výsledek	
4 nebo 3	akceptovatelný výsledek	Je vhodné výsledky barvení zlepšit (existuje prostor pro zlepšení).
2 a méně	nevyhovující výsledek	Jde o 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 NORDIQ, etablovaného evropského poskytovatele EHK pro imunohistochemii. Velmi doporučujeme při výběru primárních protilátek a optimálních protokolů prostudovat právě tyto stránky (www.nordiq.org).

Hodnocení experty vychází z hodnotících kritérií NORDIQ, 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.

Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 72 pracovišť, z nich 11 ze Slovenska.

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 CK AE1/AE3 nebo E-cadherinu v hepatocytech, nebo slabá pozitivita Glypicanu 3 ve stromálních buňkách choriových klků.

Výsledky v tomto cyklu byly překvapivě slabší než v předchozích, přestože testovány byly ty nejobyčejnější a nejčastěji používané protilátky. Celková úspěšnost byla u některých barvení pod 80 %. Naopak, u speciálních protilátek, jako MSH2 nebo hepatocytární antigen je úspěšnost absolutní. Bohužel se nám nedaří dostat na 100 % kvalitu průkazu Ki 67. Stále existují pracoviště, která tento klinicky extrémně závažný marker barví slabě.

Prosíme čtete individuální komentáře, které naleznete ve svých výsledkových listech.

Poznámky k jednotlivým testům

Vzorek A

S-100 (úspěšnost 97 %): Některé reakce mají výraznější pozadí (jako nevyhovující jsme označili preparáty, u nichž podle našeho názoru hrozí falešně pozitivní zhodnocení), jiné jsou slabé (což se projevovalo zejména na buňkách Langerhansových ostrůvků a adipocytech, případně na dendritických buňkách v tonzile). Doporučujeme zvážit, zda je nutno používat antigen retrieval (některé protilátky jej nevyžadují a aplikace retrievalu vede k nárůstu pozadí!) a zda nelze primární protilátku více / méně ředit.

Vimentin (úspěšnost 100 %): Bez komentáře.

Vzorek B

Hladkosvalový aktin (SMA) (úspěšnost 78 %): I zde jsme se setkali s oběma extrémy – jednak neobyčejně slabé výsledky barvení (3 laboratoře), jednak neobvykle silné falešné barvení ve všech buněčných jádrech prakticky ve všech tkáních a všech populacích. Tyto výsledky jsme nemohli než označit za nevyhovující, tento problémem se týká deseti laboratoří z 61! Možných vysvětlení je více, nelze vyloučit, že je na trhu špatná šarže protilátky (v žádném případě ale nemáme dost informací na to, abychom v tomto směru mohli činit jakékoli závěry). Lze také uvažovat o vlivu vysokých letních teplot na tkáň při transportu (všichni ale víme, že tkáňové řezy jsou v termostatu vystaveny poměrně vysokým teplotám bez změny reaktivity a navíc všechna skla byla transportována za stejných teplot – proč by tedy bylo ovlivněno jen 10 z nich). Náhodná kumulace stejné chyby v deseti laboratořích je velmi málo pravděpodobná. Všem účastníkům, kterých se uvedený problém týká, zasíláme individuální komentáře a velmi prosíme o zpětnou vazbu (e-mail nebo telefon) a pomoc při hledání příčiny této neobvyklé situace.

Desmin (úspěšnost 100 %): Bez komentáře.

Vzorek C

Hepatocytární antigen (úspěšnost 100 %): Většina výsledků je velmi dobrých, některá skla měla pozitivitu v játrech „jen“ středně silnou a hned se to projevilo nižší až negativní reakcí v hepatocelulárních karcinomech. Je tedy potřeba nastavit reakci tak, aby se játra barvila velmi silně. „Low-expressor“ pro kontrolní tkáň bohužel není k dispozici.

E-cadherin (úspěšnost 85 %): Všechny nevyhovující výsledky jsou shodně velmi slabá barvení, vhodný kontrolní materiál jsou játra, všechny hepatocyty musí vykazovat alespoň slabou membránovou pozitivitu.

CK AE1/AE3 (úspěšnost 70 %): I zde jsme zaznamenali oba barevné extrémy – část vzorků byla s vysloveně slabým barvením (zcela negativní jaterní parenchym a ruku v ruce s tím i falešně negativní hepatocelulární karcinomy, neobarvení části dlaždicového epitelu a dokonce i celých apendikálních krypt), šest laboratoří naopak velmi silně nabarvilo i hladkou svalovinu ve vzorcích ze stěny GIT (přitom ostatní tkáň kromě epitelů byly negativní, nešlo o difúzní přibarvování ale o poměrně „specifickou“ pozitivitu v hladkém svalu). Podobně jako u SMA tento fenomén nedovedeme jednoznačně vysvětlit, zatím jsme jej v předchozích cyklech nezaznamenali. Všem účastníkům, kterých se uvedený problém týká, zasíláme individuální komentáře a velmi prosíme o zpětnou vazbu (e-mail nebo telefon) a pomoc při hledání příčiny této neobvyklé situace.

Cyklus: VIB2/18 – Všeobecná imunohistochemie - barvení**Vzorek D****MSH-2** (úspěšnost 100 %): Bez komentáře.

p53 (úspěšnost 84 %): Všechna nevyhovující skla shodně vykazovala slabou úroveň barvení. K nastavení reakce je třeba použít normální tkáň s vyšší přirozenou proliferací (tonzila, apendix), kde by měla být jasná, slabá až středně silná heterogenní pozitivita v části buněk, zejména v bazích krypt resp. v germinálních centrech folikulů. Protein p53 je ubikvitně exprimován ve všech buňkách, je ale velmi rychle degradován a nabarvíme jej pouze slabě právě jen v silně proliferujících nenádorových populacích (kam ale patří i některé fibroblasty a lymfocyty ve stromatu nádorů!). Jedinou smysluplnou aplikací imunohistochemie p53 je rozpoznání mutačního fenotypu, který je dvojitý: extrémně silná exprese ve všech nádorových buňkách (mutovaný protein se v buňce hromadí) NEBO zcela negativní exprese (mutace vede k tomu, že protein vůbec nevznikne). V případě slabě nastaveného barvení p53 dokážeme většinou určit první typ mutace, ale druhý typ s absencí proteinu neurčíme, protože sklo s negativitou ve stromálních i v nádorových buňkách je NEHODNOTITELNÉ! Toto jsou případy, které jsme označili za nevyhovující, protože provedené barvení neslouží danému (a jedinému) účelu.

Ki 67 (úspěšnost 88 %): Většina barvení je zcela v pořádku, jako nevyhovující jsme označili případy se slabší pozitivitou – pozná se zejména na germinálních centrech. Jako vždy v předchozích cyklech jsme na Ki 67 byli poněkud přísnější než na jiné antigeny, neboť jde v moderní klinické onkologii o nesmírně důležitý marker a nemůžeme připustit, aby byl v některých laboratořích systematicky podhodnocován. Mohlo by to vést k poškození onkologických pacientů. Nabízíme zde pomoc – v případě, že jste s Ki 67 neuspěli nyní či v předchozích cyklech, neváhejte se obrátit na supervizora nebo jinou IHC laboratoř, k níž máte důvěru, a pokuste se najít řešení – obvykle stačí jen málo.

Vzorek E

Glypican 3 (úspěšnost 74 %): Přestože jde o poměrně speciální protilátku, často jsme se setkali s nízkou pozitivitou. Pokud je trofoblast jen slabě pozitivní, stromální buňky choriových klků jsou negativní, pak prakticky vždy jsou i oba hepatocelulární karcinomy negativní (do kontrolního materiálu byl záměrně vybrán jeden HCC se silnou a jeden se slabou expresí Glypicanu 3). Takovéto barvení pak neplní svůj účel – podpořit dg. malignity – a tyto případy jsme se rozhodli označit za nevyhovující.

CK 20 (úspěšnost 96 %): Bez komentáře.

CK AE1/AE3 (úspěšnost 89 %): Komentář viz výše.

Formální nedostatky a technické problémy

Téměř všichni účastníci nám spolu se skly zaslali i korektní popis způsobu zpracování skel (tj. v průvodním listu zakroužkovali, jaké barvení provedli, nebo zakroužkovali, že dané sklo nezpracovali).

Jeden účastník ale průvodní list vůbec nevyplnil (tj. nezakroužkoval vůbec nic), a proto jsme jej z cyklu vyřadili. Další dva pak průvodní list vyplnili neúplně (vynechali některá skla). **Skla, pro která účastník neuvede použité barvení, nezpracováváme** (experti je nehodnotí, viz výše).

Další problém, na který opakovaně narážíme, spočívá v tom, že někteří účastníci nám vracejí skla, která před vložením do krabiček zřejmě nebyla suchá – důsledkem je, že se skla do krabiček přilepí a jejich vyjmutí je velmi obtížné a může vést k poškození skla. **Proto prosíme, abyste skla do krabiček vkládali vždy suchá.**

Účastníci, kterých se výše uvedené připomínky týkají, naleznou ve svých průvodních listech individuální komentáře.

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	3	5	15	22	0	25
	relativní	-	-	2,8 %	4,2 %	6,9 %	21 %	31 %	-	35 %

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

Třetina 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 zaznamenalo 5 (tj. 6,9 %) účastníků – tento stav by měl být vnímán jako impuls ke zlepšení.

Cyklus: VIB2/18 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

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 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.