

Cyklus: HB1/19 – Histologické barvení

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2019*, 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.

**Součástí tohoto cyklu byla i studie zaměřená na cytologické barvení (vzorek C).
Hodnocení vzorku C se účastníkům nezapočítává do celkového hodnocení cyklu.**

Vzorky

Byly použity vzorky (histologická skla se vzorky tkání), které byly připraveny na pracovišti subdodavatele. Každý účastník obdržel 2 skla (označená A a B) a pro každé sklo bylo předepsáno barvení, v některých případech měli účastníci k dispozici i náhradní barvení, které mohli provést v případě, že předepsané barvení rutinně nepoužívají. Účelem testování bylo zhodnotit úroveň barvení tkáňových řezů běžným barvením hematoxylin-eozínem (HE) a dále zhodnotit barvení vaziva a hladké/kosterní svaloviny ve vzorcích ze stěny močového měchýře, resp. rhabdomyomatózního mesenchymálního hamartomu, metodami modrý trichrom, alternativně pak metodou dle van Giesona. V případě barvení modrý trichrom bylo ještě sledováno ev. barvení stěny cév ve vzorku z horních dýchacích cest z případu ANCA-pozitivní floridní nekrotizující vaskulitidy; toto barvení však nebylo skórováno a jeho výsledek nijak neovlivňoval celkové hodnocení testování. K testování sloužily pro obě metody tkáňové řezy získané z téhož složeného tkáňového bločku.

V pilotním režimu bylo dále testováno barvení cytologického vzorku ascitické tekutiny metodou dle Giemsy, jednalo se o preparáty bez další fixace zaschlé na vzduchu po natření na podložní sklíčko. Účelem této pilotní studie je příprava na zavedení hodnocení cytologického barvení negynekologické cytologie v rámci programu HB od roku 2020; z reakcí odborné veřejnosti v minulosti jsme zjistili, že v rámci akreditačních šetření na pracovištích je některými odbornými posuzovateli požadováno doložení mezilaboratorního srovnání hodnocení negynekologické cytologie (v určité analogii s cytologií gynekologickou). Účast pracovišť v cyklech HB od roku 2020 by měla nahradit toto mezilaboratorní srovnání i v oblasti negynekologické cytologie, podobně jako se tomu stalo letos pro běžná histologická barvení.

Hodnocení výsledků účastníků

Úkolem pracovišť bylo:

1. Provést předepsané (ev. náhradní) barvení standardním postupem, který je používán v rámci rutinního provozu laboratoře 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

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

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

Akceptovatelné: Pro barvení HE slabé dobarvení jader, umožňující nicméně ještě posoudit detaily jaderné architektiky. Pro metody modrý trichrom a van Gieson jakákoliv intenzita barvení, která ještě umožnila odlišit hladkou/kosterní svalovinu ve vzorcích od okolní vazivové tkáně.

Nevyhovující: Pro barvení HE velmi slabé barvení cytoplazmy buněk eozínem, prakticky neumožňující hodnocení tkáně, velmi slabé barvení jader buněk hematoxylinem, neumožňující již posoudit detailně architektiku jader.

Pro metody modrý trichrom a van Gieson stejná barva i intenzita výsledného zbarvení ve svalové tkáni a okolním vazivu, která již nedovolila odlišit tyto struktury od sebe.

Kvalita barvení konkrétního skla není hodnocena, pokud některý expert označí sklo jako nehodnotitelné (což v tomto cyklu nenastalo).

Složení týmu expertů	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. Doc. MUDr. Tomáš Jirásek, 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:

Cyklus: HB1/19 – Histologické barvení

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**.

Nulový počet bodů mohou dostat jen ty preparáty, u kterých se všichni hodnotící experti shodnou, že takto barvené preparáty nelze použít v rutinní diagnostické praxi.

Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 55 pracovišť, z nich 3 ze Slovenska.

Vzorek A

HE (úspěšnost 100 %): Výsledky hovoří jasně, barvení HE je naprostý základ metodiky jakékoli histomorfologické laboratoře a testovaná pracoviště toto barvení zvládají v kvalitě dostatečné pro diagnostiku. Nižší hodnocení (akceptovatelný výsledek) bylo použito pouze zcela ojediněle v případech, kdy se ve vzorcích slabě barvila jádra. Barvení HE má mnoho variant, které jsou používány dle lokálních zvyklostí a tradic pracovišť. To, zda se subjektivně konkrétní barvení líbí či nelíbí jednotlivým expertům, bylo při hodnocení předmětem diskuze, neovlivňovalo však nijak bodové hodnocení jednotlivých preparátů; klíčovým parametrem hodnocení byla použitelnost barvení v rutinním provozu. Diskutovali jsme i možnost zavést do budoucna uvedení typu chemikálií použitých pro HE barvení konkrétními laboratořemi, jeví se nám to nicméně jako t. č. nadbytečné, jelikož v barvení HE zatím mají hodnocené laboratoře 100 % úspěšnost.

Vzorek B

Modrý trichrom (MT, úspěšnost 100 %): Jedná se o základní histologické barvení, které opět celkově umíme, byť ne každá laboratoř má toto barvení, zdá se, zavedené. Výsledky barvení hodnotíme opět jako dostatečné pro rutinní diagnostiku, pouze v jednom případě expertům vadila slabá intenzita barvení svaloviny vzorku. Účelem tohoto cyklu bylo otestovat, zda barvení metodou MT na pracovištích dokáže zvýraznit přítomnost vaziva ve tkáni a odlišit jej od přítomné svaloviny (hladké, či kosterní) a závěr zní, že dokáže. V některých případech, kdy byly preparáty hodnoceny jako akceptovatelné, a to z důvodu slabé intenzity barvení vaziva/svaloviny, doporučujeme takto hodnoceným pracovištím **zvážít**, zda intenzita barvení tkání je v jejich laboratořích dostatečná. Uvedené rozdílly mohou souviset s tloušťkou tkáňových řezů; barvení, které se na tenčím, v EHK použitém řezu, jeví jako slabé, může být v silnějším řezu již dobře hodnotitelné; záleží na lokálním nastavení barvicí techniky v konkrétní laboratoři. Silná (dle některých expertů až příliš silná) intenzita barvení nebyla v tomto cyklu příčinou nižšího bodového hodnocení žádné ze zúčastněných laboratoří.

Fakultativně jsme se dále zaměřili na hodnocení barvení fibrinoidní nekrózy ve stěně zastižených cév vzorku z dýchacích cest od pacienta s ANCA pozitivní vaskulitidou. U části laboratoří se tato oblast znázorňovala červeně, u většiny laboratoří jsme však nepozorovali výraznější rozdíl v barvení oproti okolní stěně cév. Možným vysvětlením je nehomogenní distribuce změn v postižených cévách. Pokud nicméně laboratoře používají barvení modrý trichrom jako detekci fibrinoidní dystrofie/nekrózy ve svých vzorcích, doporučujeme znovu otestovat toto barvení na vhodném vlastním vzorku. Jak bylo uvedeno výše, barvení MT ve stěně cév stížených vaskulitidou nebylo zavazato do celkového hodnocení metody; do budoucna se v dalším cyklu HB můžeme ev. zaměřit pouze na tuto problematiku při použití vhodnějšího testovacího vzorku.

van Gieson (úspěšnost 92 %): Jedná se o základní histologické barvení, které opět celkově umíme. Výsledky barvení hodnotíme opět jako převážně dostatečné pro rutinní diagnostiku. Ve dvou případech však došlo ke konsensu všech expertů a vzorky byly hodnoceny jako nevyhovující; důvodem k takovému hodnocení bylo barvení hladké svaloviny ve vzorcích, které v obou případech bylo narůžovělé, nikoli žluté, a hlavně nebylo možné odlišit intenzitu a odstín barvení svaloviny od stejného barvení přítomného vaziva. V rutinním provozu používají některé laboratoře barvení van Gieson k posouzení průniku urotelových nádorů do hladké svaloviny stěny močových cest; v těchto dvou případech by v praxi barvení neumožnilo spolehlivě odlišit svalovinu od vaziva a nebylo by dobře použitelné, případně by bylo až matoucí. V ostatních případech můžeme konstatovat, že barvení van Gieson na pracovištích dokáže zvýraznit přítomnost vaziva ve tkáni a odlišit jej od přítomné svaloviny (hladké, či kosterní). V některých případech, kdy byly preparáty hodnoceny jako akceptovatelné, a to z důvodu slabé intenzity barvení vaziva/svaloviny, doporučujeme takto hodnoceným pracovištím **zvážít**, zda intenzita barvení tkání je v jejich laboratořích dostatečná. Uvedené rozdílly mohou souviset s tloušťkou tkáňových řezů; barvení, které se na tenčím, v EHK použitém řezu, jeví jako slabé, může být v silnějším řezu již dobře hodnotitelné; záleží na lokálním nastavení barvicí techniky v konkrétní laboratoři. Silná (dle některých

Cyklus: HB1/19 – Histologické barvení

expertů až příliš silná) intenzita barvení nebyla v tomto cyklu příčinou nižšího bodového hodnocení žádné ze zúčastněných laboratoří.

Vzorek C (cytologie – studie)

Giemsa (úspěšnost 98 %): Pilotní kolo studie prokázalo, že hodnocení je možné; problém se vyskytl pouze v jediném případě, kdy v preparátu nebyla zastížena přítomnost cytologicky hodnotitelných buněk, které měly zcela nepřehlednou morfoloii, nebylo možné odlišit jednotlivé buňky od sebe, téměř nešlo odlišit jejich jádro od cytoplazmy a bylo zcela nemožné hodnotit jemné detaily jaderné architektiky. Vysvětlení zatím nemáme, v ostatních laboratořích byl identický materiál nabarven v kvalitě umožňující běžné zhodnocení v normálním provozu. V nepilotním režimu bychom tento preparát nejspíše vyřadili jako nehodnotitelný, a tedy nehodnocený. V podzimním cyklu (HB2/19) proběhne ještě v souladu s požadavkem výboru Společnosti českých patologů další kolo pilotního testování vzorků negynekologické cytologie, tentokrát na fixovaném materiálu, který umožní testovat další barvení (PAS, HE).

Způsob provedení barvení

Formou doplňující informace účastníci uváděli, zda barvili ručně či automaticky. Zde jsou odpovědi (počty účastníků).

	<i>Neuvedeno</i>	<i>Ručně</i>	<i>Automat</i>
Vzorek A	-	20	35
Vzorek B	-	48	4
Vzorek C	-	47	5

Zatím jsme nepozorovali rozdíly mezi ručním a „strojovým“ barvením ani u jedné z metod, detailnější analýza může být předmětem některého z příštích cyklů EHK.

Souhrn

Většina zaslaných preparátů vykazovala kvalitní barvení a byly dle názoru expertů použitelné v rutinní praxi; tloušťka řezů je otázkou lokálního zvyku pracovišť, stejně tak intenzita barvení tkání hematoxylinem a eozínem. Vzorky, které některé laboratoře pokládají za výborné, mohou být jiným pracovištěm hodnoceny jako tlusté a nevyhovující, případně přebarvené (a naopak). Opakujeme, že měřítkem hodnocení je použitelnost v rutinní praxi, nikoli „umělecké vyznění“ vzorku před „porotou“.

V jednom případě byl štítek s popisem nalepen na opačné straně preparátu, než byl umístěn řez - toto nijak neovlivnilo hodnocení, za upozornění děkujeme.

Celkové výsledky pilotního kola studie s barvením negynekologické cytologie projednáme se Společností českých patologů, a pokud bude výsledkem tohoto jednání zařazení hodnocení barvení negynekologické cytologie do programu **Histologické barvení (HB)** od roku 2020, budeme vás o této skutečnosti informovat a budete mít možnost se tohoto upraveného programu rutinně zúčastnit již v roce 2020.

Formální nedostatky

Dva účastníci použili barvení, které nebylo ani předepsané, ani náhradní – taková skla jsme nezpracovali. Prosíme, pokud nemáte k dispozici žádné z barvení uvedených v průvodním listu, pak příslušné sklo nezpracovávejte.

Odborná supervize: Doc. MUDr. Tomáš Jirásek, Ph.D.
Krajská nemocnice Liberec, a.s.
Oddělení patologie
Husova 357/10, 460 01 Liberec
e-mail: tomas.jirasek@nemlib.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.

Cyklus: HB1/19 – Histologické barvení**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.
<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.