

Cyklus: IHC1/19 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

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.

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 FISH; vzorky do složeného bloku byly voleny takto: po jednom tumoru s expresí 0, 1+ a 3+, dva tumory s expresí 2+ a bez amplifikace genu Her-2. Při kontrolních barveních na pracovišti subdodavatele se tyto 2+ tumory (zejména jeden z nich) opakovaně barvily jako hraniční 1+ až 2+, proto bylo na základě konsenzu expertů rozhodnuto, že při hodnocení výsledků účastníků budou akceptovány i výsledky 1+. Do budoucna se budeme vždy snažit o zařazení vzorků s jasnou 2+ expresí a současně s amplifikací. Získání takového materiálu v množství dostatečném pro přípravu EHK je ale velmi obtížné.

Komentář supervizora

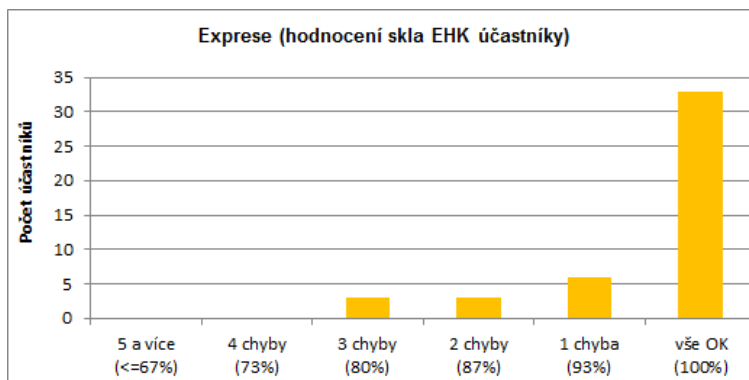
Tohoto cyklu se zúčastnilo 45 laboratoří, z toho 11 ze Slovenska.

Složení týmu expertů	MUDr. Iva Babánková MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. MUDr. Zdeněk Pavlovský
-----------------------------	----------------------------------------------------------------------------

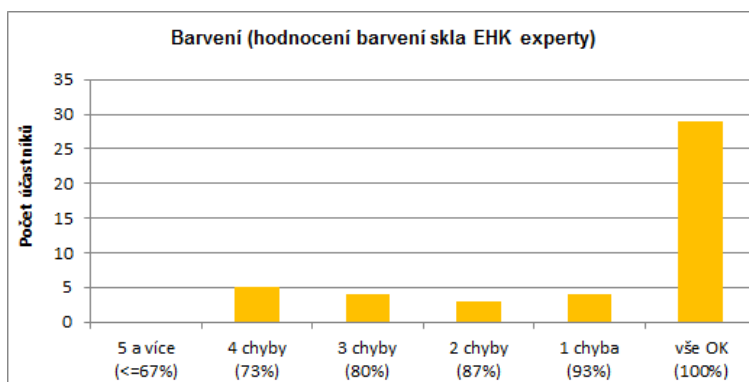
Vzorky EHK

Při hodnocení vzorků jsme jak při určování vztažných hodnot pro interpretaci provedenou účastníky, tak při hodnocení barvení experty, vzali v úvahu výše popsanou hraniční expresi 2+ vzorků. Proto jsme u vzorků 2+ akceptovali rovněž výsledky 1+.

Při **interpretaci vzorků účastníky** (vzorků bylo 15) dosáhlo 100 % úspěšnosti 33 (tj. 73 %) účastníků, úspěšnost 93 % (tj. 1 chyba) zaznamenalo 6 účastníků - celkové rozložení úspěšnosti ukazuje obrázek vpravo.



Při **hodnocení barvení experty** (opět 15 vzorků) dosáhlo 100 % úspěšnosti 29 laboratoří (tj. 64 % účastníků), úspěšnost 93 % (tj. 1 chyba) zaznamenali 4 účastníci - celkové rozložení úspěšnosti ukazuje obrázek vpravo.



Nesetkali jsme se 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 interpretace silně pozitivních (3+) vzorků nečinila účastníkům potíže. Pokud by tedy složený blok rozeslaný v rámci tohoto cyklu obsahoval jen vzorky s těmito dvěma typy exprese, byly by výsledky výborné.

Jak vyplývá ze shora uvedeného, v podstatě všechny laboratoře dobře barví a hodnotí jak vzorky negativní (0/1+), tak vzorky pozitivní (3+). To je jednoznačně velmi dobrá zpráva.

V případě vzorků, které měly při přípravě expresi 2+ (stanoveno metodou Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu) jsou výsledky účastníků takové, že úrovně barvení 2+ dosáhlo:

- maximálně 93 % účastníků u vzorku C3 (jen jeden účastník označil tento vzorek 1+)

Cyklus: IHC1/19 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

- minimálně 36 % účastníků u vzorku E3 (53 % účastníků označilo tento vzorek 1+)

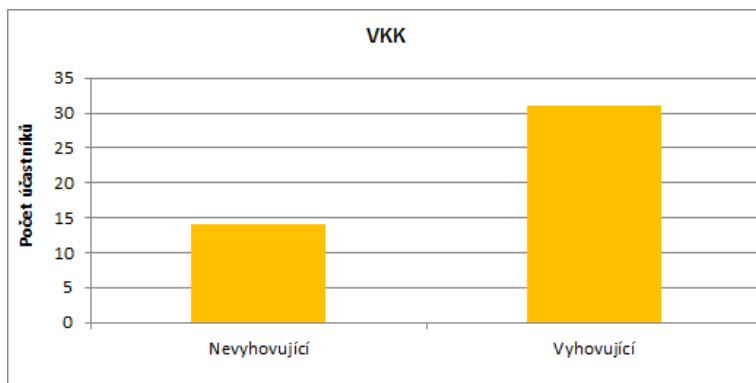
Dokonce i při použití stejné metodiky jakou použil dodavatel vzorků (Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu) nebylo mezi účastníky dosaženo shody (výsledek 2+ uvedlo u vzorku C3 96 % těchto účastníků a u vzorku E3 jen 21 %). To může být způsobeno variabilitou exprese v rámci tumoru, přenosem materiálu do složeného bloku nebo stárnutím řezů na sklech (čas mezi přípravou vzorků a provedením barvení je cca tři týdny). Pokud bereme v potaz, že šlo o vzorky bez amplifikace genu Her-2, pak je nutné připustit, že i výsledek 1+ je výsledek akceptovatelný (což je v hodnocení zohledněno - obdobně k hodnocení Her-2 IHC přistupuje i NORDIQC). Naopak vzorek 2+ se zcela negativním výsledkem už je opravdu nevyhovující, protože ukazuje na nízkou senzitivitu metody.

Doporučujeme tedy všem účastníkům znovu prohlédnout svá skla a zhodnotit, zda v místech předpokládané 2+ pozitivitu (vzorky A2, C1, C2, C3, D1 a E3) dosáhli alespoň 1+ pozitivitu. Pokud ano, pak není závažnější důvod ke znepokojení. Je-li jejich výsledek v těchto vzorcích 0, pak je metoda „slabá“, nízce senzitivní, a je potřeba ji optimalizovat.

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.

Vzorky VKK (vnitřní kontroly)

Při **bodování skel VKK experty** (sklo EHK hodnotí experti jako jeden celek) získalo hodnocení *vyhovuje* 31 (tj. 69 %) účastníků, jako *nevyhovující* označili skla VKK experti u 14 (tj. 31 %) účastníků - celkové rozložení úspěšnosti ukazuje obrázek vpravo.



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+) ke kontrolám pokrývajícím širší spektrum stupňů pozitivitu. Přesto jsme však při procházení preparátů od jednotlivých účastníků narazili na nemalé rozdíly.

Za jediné rozumné 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. Navíc core-cut biopsie jsou zatíženy vznikem okrajových artefaktů.

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 resekcí 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 správné exprese 3+, 1+ a 0 bylo účastníkem

Cyklus: IHC1/19 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

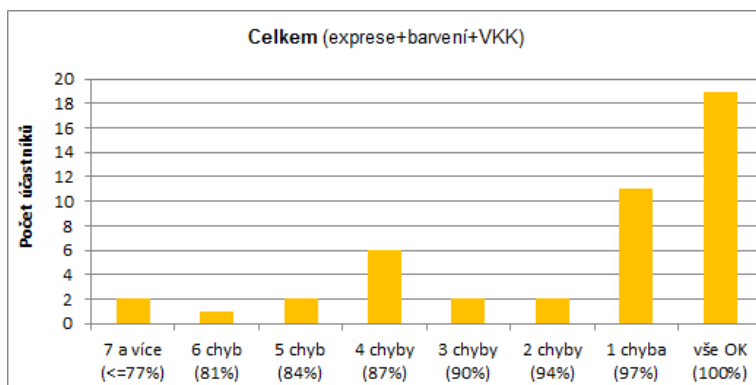
zasláno s tím, že výsledek má být 3+, 0 a 0 (tedy tak jak to vyšlo, nikoli tak, jak to mělo být správně). Toto je samozřejmě zcela nepřijatelné.

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.

Komplexní pohled na výsledky

Celkové úspěšnosti (zahrnující interpretaci vzorku EHK účastníkem + bodování barvení vzorku EHK experty + bodování vzorku VKK experty: tedy celkem 31 zkoušek) jednotlivých účastníků ukazuje graf vpravo.

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



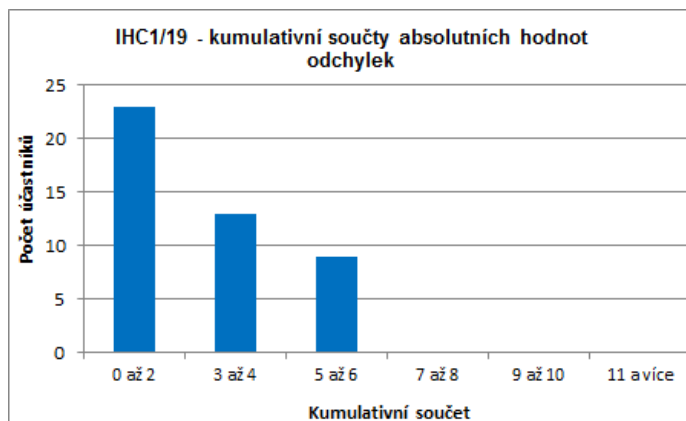
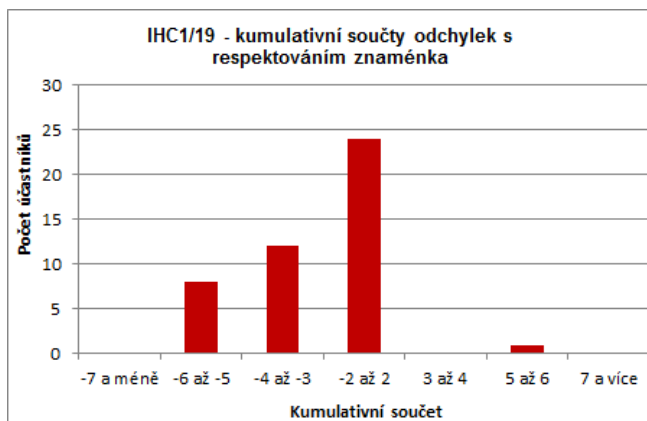
Pro komplexní vyhodnocení toho, jak si laboratoř v EHK vedla, lze použít 6 zdrojů informací, z nichž žádný nelze interpretovat osamoceně, ale je třeba zvážit všechny dohromady. Jsou to:

- 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

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 8 pracovišť, zatímco u 23 účastníků byl maximálně 2. **Tento výsledek je velmi dobrý.**

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

Cyklus: IHC1/19 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

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.

Formální nedostatky

Dva účastníci nepopsali v průvodním listu svůj vzorek VKK. Jde o chronický problém daných účastníků, kterým na toto téma píšeme opakovaně individuální komentáře, na které nereagují.

Závěr

U 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: 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)	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 porovnat 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 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.
Poznámky: <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.