Cyklus: VIB2/19 – Všeobecná imunohistochemie - 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.

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 provádí tým složený ze 3 expertů. Experti hodnotí **kvalitu barvení** testovacích preparátů na škále 0 až 2 body pro každé jednotlivé sklo takto:

Počet bodů	***Popis***	***Kritéria***
2	Vyhovující barvení	
1	Akceptovatelné barvení	Nízká úroveň očekávaného barvení, silné pozadí.
0	Nevyhovující barvení	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 nebo pokud je účastník obarvil jiným než předepsaným nebo náhradním barvením, nebo barvení vůbec neuvedl.
Experti posuzují všechny vzorky anonymně, tj. bez znalosti pracoviště, které vzorek zaslalo.

Složení týmu expertů	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. MUDr. Patrik Flodr, Ph.D. MUDr. Karel Veselý, Ph.D.

Experti si na několika anonymních modelových případech společně ověřili 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	Vyhovující 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 „vyhovující 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: VIB2/19 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 71 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. středně silná pozitivita CD 99 v buňkách basální vrstvy jícnového epitelu nebo střední pozitivita CD 10 v germinálních centrech lymfatické tkáně.

Výsledky v tomto cyklu byly velmi dobré. Celková úspěšnost u většiny antigenů přesahovala 90 %, velká část výsledků byla dokonce hodnocena jako výsledky optimální. Některé antigeny ale dopadly nad očekávání špatně, zejména CD 99 a kupodivu i velmi rozšířená protilátka proti HMW CK. Drtivá většina nevyhovujících i akceptovatelných výsledků je podmíněna slabší než očekávanou pozitivitou, falešné pozitivity jsou jen ojedinělé. Jelikož u všech testovaných antigenů dosáhla naprostá většina laboratoří výsledku optimálního, tedy stejně intenzivního, jako bylo očekáváno, nelze argumentovat, že slabší barvení bylo zapříčiněno nevhodně zvolenou testovací tkání nebo odlišným zpracováním tkání ve srovnání s vlastní laboratoří účastníka. Každý výsledek v kategorii „akceptovatelný“ by měl být podnětem k zamyšlení a k optimalizaci metody. U Ki-67 supervizoři tradičně kladli na kvalitu barvení vyšší nároky než na ostatní antigeny, neboť jde o marker s bezprostředním klinickým dopadem. Obdobně u LCA, který se indikuje zejména pro skupinové zařazení (lymfom versus karcinom apod.) nediferencované neoplázie a je tedy na místě vysoká senzitivita IHC reakce, jsme slabé výsledky posuzovali jako nevyhovující, protože podle našeho přesvědčení v této aplikaci neobstojí.

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

Dosažené úspěšnosti (podrobný přehled včetně počtů výsledků najdete v případě zájmu ve statistice na webu)

Vzorek A

CD 5 - úspěšnost 81 % - prakticky všechny nevyhovující výsledky připadají na vrub slabých reakcí, klíčovým materiálem ukazujícím nízkou senzitivitu byla tkáň B-CLL, která má vykazovat jasnou, alespoň slabou pozitivitu ve všech nádorových elementech.

CD 3 - úspěšnost 100 % - výsledky nevyžadují komentář.

Vzorek B

CD 79a - úspěšnost 96 % - výsledky nevyžadují komentář.

CD 20 - úspěšnost 100 % - výsledky nevyžadují komentář.

Vzorek C

LCA - úspěšnost 92 % - prakticky všechny nevyhovující výsledky připadají na vrub slabých reakcí, klíčovým materiálem ukazujícím nízkou senzitivitu byla tkáň tonzily, která má vykazovat silnou pozitivitu ve všech lymfoidních buňkách. S ohledem na typickou aplikaci LCA jako liniového markeru hemato-lymfoidních neoplázií, což je klíčová funkce, jsme slabě nabarvené případy označovali jako nevyhovující, zlepšit by se ale měly i laboratoře s akceptovatelným výsledkem.

Ki 67 - úspěšnost 95 % - výsledky nevyžadují komentář. Poznámka: U cca 8 účastníků se objevila falešná zřetelná membránová pozitivita - může jít o jev spojený s konkrétním klonem protilátky a při hodnocení jsme tento jev nepenalizovali.

Vzorek D

CD 99 - úspěšnost 62 % - prakticky všechny nevyhovující výsledky připadají na vrub slabých reakcí, klíčovým materiálem ukazujícím nízkou senzitivitu byla tkáň dlaždicového epitelu jícnu či tonzily. Silně se měly barvit Sertoliho buňky ve vzorku plazmocytomu varlete a dále lymfocyty a endotelie.

CD 138 - úspěšnost 100 % - výsledky nevyžadují komentář.

HMW CK - úspěšnost 86 % - velmi překvapivé výsledky, opět prakticky všechny nevyhovující výsledky zapříčinily slabé až velmi slabé reakce. Epitel jícnu a tonzily musí vykazovat jasnou silnou pozitivitu v celém rozsahu.

Vzorek E

Bcl-2 - úspěšnost 100 % - výsledky nevyžadují komentář.

CD 10 - úspěšnost 89 % - prakticky všechny nevyhovující výsledky připadají na vrub slabých reakcí, klíčovým materiálem ukazujícím nízkou senzitivitu byla tkáň tonzily, která má vykazovat alespoň středně silnou pozitivitu v germinálních centrech. Pozitivita (většinou silná) v ledvinných kanálcích byla pozorována i v materiálech, které jsme označili za nevyhovující, to mj. ukazuje nevhodnost ledviny jako materiálu k validaci metody.

Cyklus: VIB2/19 – Všeobecná imunohistochemie - barvení

Poznámky účastníků
Připomínky k nižší kvalitě vzorků byly výjimečné. Tkáň pankreatu, použitá v tomto cyklu, vykazovala známky autolýzy, což jsme při přípravě vzorků zaznamenali, antigenicita tkáně nebyla zachována a při posuzování jsme na výsledek reakce v pankreatu nebrali zřetel. Jeden účastník poznamenal: *Materiál C,D - nejedná se o normální tkáň jater- známky lehké léze subak. chron., aktivace, incipientní fibroprodukce, hraniční steatóza,aj.* Tato poznámka je správná, termín „normální“ jsme použili ve smyslu „nenádorová“, zejména ve vztahu k očekávané imunoreaktivitě. Za tuto nepřesnost se omlouváme.

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	1	3	7	12	24	0	24
	relativní	-	-	1,4 %	4,2 %	9,9 %	17 %	34 %	-	34 %
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 zaznamenali 4 (tj. 5,6 %) účastníci, pro které by se mělo jednat o 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:

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 vyhovujících nebo alespoň akceptovatelných.
Poznámky: • *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.