

IHC2/21: Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2021*.

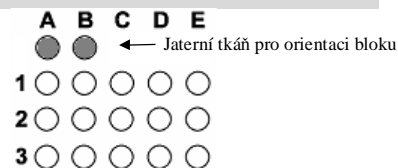
Vzorky**Vzorky EHK**

Každý účastník obdržel jedno histologické sklo (TMA). Všechna skla obsahovala shodně uspořádané vzorky z identických zdrojových tkáňových bloků. Mapa bloku TMA je zobrazena vpravo.

Vzorky byly připraveny subdodavatelem.

Vzorky VKK (vnitřní kontrola kvality)

Kromě vzorku EHK zasílají účastníci poskytovateli i své vlastní, rutinní sklo VKK.

**Vztažné hodnoty (AV) a metodika hodnocení výsledků**

Hodnocení výsledků účastníků je v tomto programu EHK rozděleno na 2 části.

Část 1

V první části jsou hodnoceny výsledky stanovení **expres** HER-2/neu uvedené účastníky pro jednotlivé pozice TMA.

Obecná metodika tvorby AV

AV jsou určovány jako konsenzus expertních pracovišť. Seznam expertních pracovišť pro program IHC je k dispozici na www.sekk.cz (tlačítko EHK a odkaz Expertní pracoviště). Jedná se o všechny tzv. Referenční laboratoře pro Her-2 diagnostiku.

Konsenzus expertních pracovišť, která se cyklu zúčastnila, je dosažen v případě, že se na výsledku shodne alespoň **80 % expertů**. Shoda expertů je zkoumána nad těmito skupinami výsledků:

- negativní (0) a negativní (1+)
- pozitivní (2+)
- pozitivní (3+)

Platí tato pravidla:

- Jestliže se experti shodnou na jednom konkrétním výsledku, je tento výsledek označen jako očekávaný a komplementární výsledek z příslušné dvojice (0/1+ a 2+/3+) je označen jako akceptovatelný.
- Jestliže jsou výsledky expertů v rámci dvojice rozprostřeny tak, že se alespoň 80 % shodne na celé dvojici, ale ne na jedné hodnotě ze dvojice, jsou jako očekávané označeny oba výsledky.
- Jestliže nedojde ke konsenzu expertů, není daná pozice v bloku hodnocena (AV chybí).
- Konsenzu nemůže být dosaženo „křížem“ mezi dvojicí 0/1+ a ostatními výsledky. Například není možný konsenzus nad výsledky 1+ a 2+ současně.

Tento způsob tvorby AV eliminuje případy, ve kterých by vzorky mohly být označeny jako „neprůkazné“ či „sporné“.

Přehled AV v tomto cyklu

Zkouška	Počet výsledků z expertních pracovišť				AV
	Negativní (0)	Negativní (1+)	Slabě pozitivní (2+)	Silně pozitivní (3+)	
601 A1 exprese HER-2/neu	10				0
602 A2 exprese HER-2/neu				10	3+
603 A3 exprese HER-2/neu	10				0
606 B1 exprese HER-2/neu		6	4		chybí
607 B2 exprese HER-2/neu	5	5			0 a 1+
608 B3 exprese HER-2/neu		4	6		chybí
611 C1 exprese HER-2/neu				10	3+
612 C2 exprese HER-2/neu	9	1			0
613 C3 exprese HER-2/neu	2		2	4	chybí
616 D1 exprese HER-2/neu		2	8		2+
617 D2 exprese HER-2/neu	2	7	1		1+
618 D3 exprese HER-2/neu	7	3			0
621 E1 exprese HER-2/neu	7	3			0
622 E2 exprese HER-2/neu	6				chybí
623 E3 exprese HER-2/neu	10				0

Tabulka ukazuje, že AV nebylo možné určit na pozicích B1, B3, C3 a E2.

IHC2/21: Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Na pozicích, kde nebylo dosaženo konsenzu expertů, nejsou hodnoceny ani výsledky exprese uvedené účastníky, ani počty bodů přidělené experty.

Část 2

Ve druhé části provádí hodnocení tým složený ze 3 expertů. Tento tým hodnotí **kvalitu barvení pro sklo EHK a kvalitu skla VKK** prostřednictvím bodování na škále **0 až 2 body** (kde 0 je nejhorší výsledek).

Předem byla definována pravidla pro hodnocení, tj. kdy bude snižováno bodové ohodnocení. Jednalo se zejména o následující faktory: silná cytoplazmatická pozitivita barvení (potenciálně zvyšující obtížnost či dokonce znemožňující hodnocení membránové exprese), přibarvování pozadí, pozitivita v normální prsní žláze, intenzita a kompletnost barvení membrány vyšší nebo nižší, než má být. Rozdíl mezi barvením hodnoceným jako 0 a jako 1+ byl brán jako nepodstatný - nejedná se o situaci, která by jakkoli měnila další postup (ať již diagnostický nebo léčebný).

Experti posuzují všechny vzorky anonymně, bez znalosti identifikace účastníka i kitu, který byl pro vyšetření použit.

Tým expertů	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. doc. MUDr. Zdeněk Kinkor, Ph.D. MUDr. Dušan Žiak
--------------------	--

Bodová hodnocení se od jednotlivých expertů pro jednotlivé vzorky (pozice TMA na skle EHK a pro sklo VKK) sčítají, součty tedy mohou dosáhnout 0 až 6 bodů. Dosažené součty bodů jsou 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**.

Připomínky expertů – individuální komentáře

Jestliže experti při hodnocení konkrétního skla naleznou nedostatky, kterým by účastník měl věnovat pozornost (i když se nutně nemusely projevit snížením bodového hodnocení), zapíše pro daného účastníka textovou poznámku. Poznámka je pak vytištěna jako součást individuálního komentáře ve výsledkovém listu účastníka.

Tyto slovní připomínky mají za úkol poskytnout účastníkovi zpětnou vazbu umožňující snáze identifikovat, který z kroků analytické fáze by mohl být příčinou suboptimálního výsledku. Nežřídká vyslovili experti připomínky i přesto, že konečný výsledek všech barvení byl bezchybný – slovní hodnocení umožňuje jemnější zpětnou vazbu než prosté odebrání bodů. Pokud laboratoř např. má všechny vzorky lehce silněji nabarvené, nemusí nutně přijít o body (vzorky se svojí pozitivitou ještě „vejdou“ do hodnotících kategorií), přesto je ale při srovnání preparátu se skly z ostatních laboratoří zřejmé, že pozitivita je napříč jednotlivými dílčími vzorky vyšší a v reálném životě by to v některých případech mohlo vést k potenciální chybě. Obdobně lze při srovnání vzorků od všech účastníků identifikovat např. vzorky se známkami příliš agresivního demaskování epitopů („převařené“), s nespecifickým přibarvováním pozadí, apod.

Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 48 laboratoří, z toho 11 ze Slovenska a 1 z Maďarska.

Vzorky EHK (blok TMA)

Jak vyplývá z popisu AV výše, bylo v tomto cyklu hodnoceno **11 vzorků** (pozic v bloku TMA).

Bezproblémové vzorky

Jako zcela bezproblémové můžeme označit vzorky (pozice TMA), u kterých se experti shodli na konsenzu 0 nebo 3+. U těchto vzorků se chybné výsledky objevují naprosto ojediněle.

Problematické vzorky

Problematické vzorky (ve smyslu: chybné výsledky u nich nejsou ojedinělé) zpravidla nacházíme mezi těmi, kde se expertní laboratoře shodly na vztažené hodnotě 1+ nebo 2+. Nelze však říci, že by mezi těmito vzorky byly problematické všechny, jak ukazuje následující tabulka:

Pozice	AV	Poznámka
D1	2+	Ale 40 % účastníků jej označilo jako negativní.
D2	1+	Ale 19 % účastníků jej označilo jako 2+.

Na problematické rozlišení vzorků 1+ a 2+ může mít vliv jednak nehomogenní rozložení pozitivivity ve vzorku (pro EHK je řezáno z jednoho složeného bloku 60 řezů, takže tento jev nelze zcela vyloučit), jednak z prokazatelné interpersonální variability v hodnocení lékařem. Odchylna 1+ versus 2+ v jednotlivém případě může být tedy způsobena těmito jevy a

IHC2/21: Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

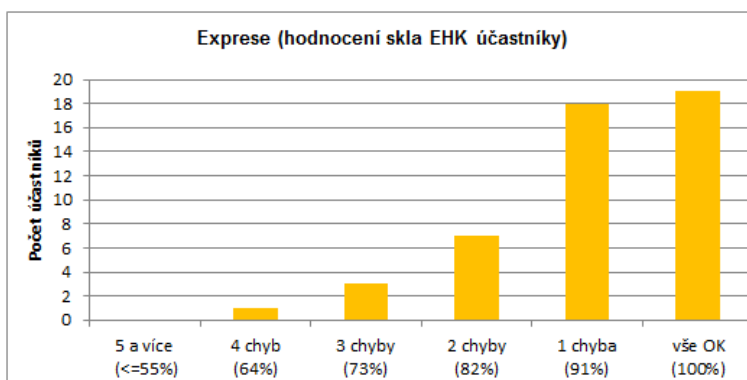
nemusí nutně znamenat důvod ke změně v nastavení IHC metodiky. V případě systematického jevu je však vhodné metodiku barvení upravit. Nejlépe lze systematickou chybu poznat z kumulativního součtu odchylek: laboratoř, která přebarvuje, bude mít při součtu absolutních hodnot odchylek „8“ aritmetický součet odchylek „+8“, tj. všechny odchylné výsledky jdou jedním směrem k silnějšímu barvení; laboratoř, která podbarvuje, bude mít při součtu absolutních hodnot odchylek „8“ aritmetický součet odchylek „-8“, tj. všechny odchylné výsledky jdou jedním směrem ke slabšímu barvení (viz níže odstavec *Kumulativní součty odchylek od vztažných hodnot*).

Opakovaně se vyskytujícím problémem jsou jisté technické nedostatky při zpracování vzorků. U vzorků EHK i u vlastních kontrolních preparátů (VKK) jsme ojediněle zaznamenali výrazné známky zbytečně agresivního demaskování antigenu. 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) 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.

Rozložení úspěšnosti pro interpretaci

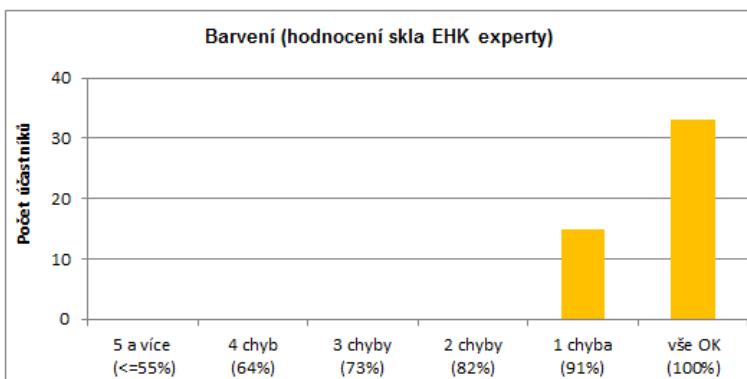
11 vzorků TMA účastníky ukazuje obrázek vpravo.

19 účastníků dosáhlo úspěšnosti 100 %,
18 účastníků dosáhlo úspěšnosti 91 %
(tj. 1 chyba) atd.

**Rozložení úspěšnosti pro hodnocení barvení**

11 vzorků TMA experty ukazuje obrázek vpravo.

33 účastníků dosáhlo úspěšnosti 100 %,
15 účastníků dosáhlo úspěšnosti 91 %
(tj. 1 chyba) atd.

**Vzorky VKK**

Pro identifikaci většiny problémů v detekci plně postačuje bazální analýza výsledků vnitřní kontroly, pokud je prováděna kontinuálně a vzorky jsou správně vybrány. Laboratoř může snadno odhalit špatnou kvalitu barvení daleko dříve, než účast v EHK – EHK problém v laboratoři zpravidla jen potvrdí. I v tomto cyklu jsme zaznamenali případy, kdy laboratoř, jejíž sklo VKK experti hodnotili jako nevyhovující, dosáhla horších výsledků i u ostatních zkoušek.

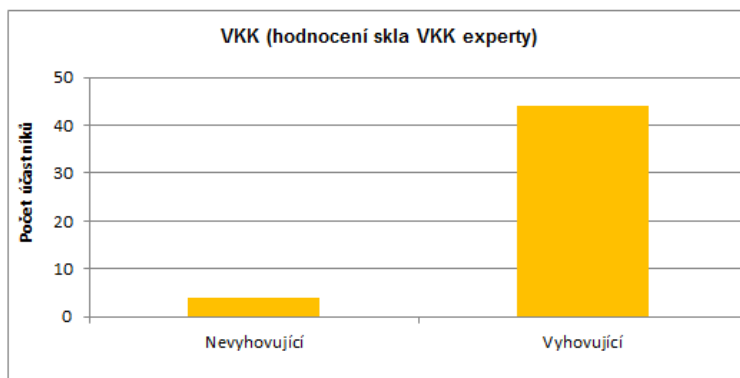
Obecně jsme hodnotili kvalitu vlastních kontrol velké části účastníků jako vyhovující, téměř všichni používají složené tkáňové bloky (tissue arrays) s intenzitami 0/1+/2+/3+. Téměř vymizelo používání vzorků z jehlových biopsií.

Jako nevyhovující byly hodnoceny takové VKK, které dle mínění expertů nemohly sloužit ke správnému nastavení senzitivity IHC metody. Jako příklad lze uvést případ, kdy laboratoř zaslala složený vzorek, dle jejich vlastního popisu se čtyřmi tkáněmi o intenzitách 0, 1+, 2+ a 3+, ale při hodnocení experty byly přítomny dva vzorky s intenzitou 0 a dva vzorky s intenzitou 2+, z toho jeden se spornou, spíše plazmatickou pozitivitou.

IHC2/21: Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

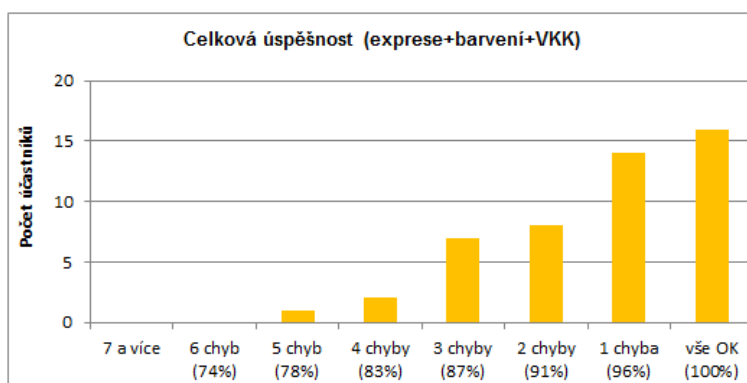
Rozložení úspěšnosti pro **hodnocení skel VKK experty** (sklo VKK hodnotí experti jako celek, tedy je hodnoceno jako jeden vzorek) ukazuje obrázek vpravo.

Uspělo 43 účastníků (tj. 90 %).
Jako nevyhovující označili skla VKK experti u 5 účastníků (tj. 10 %).

**Celková úspěšnost**

Rozložení **celkové úspěšnosti** (zahrnující interpretaci vzorku EHK účastníkem + bodování barvení vzorku EHK experty + bodování vzorku VKK experty: tedy celkem 23 zkoušek) jednotlivých účastníků ukazuje graf vpravo.

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

**Kumulativní součty odchylek od vztažných hodnot**

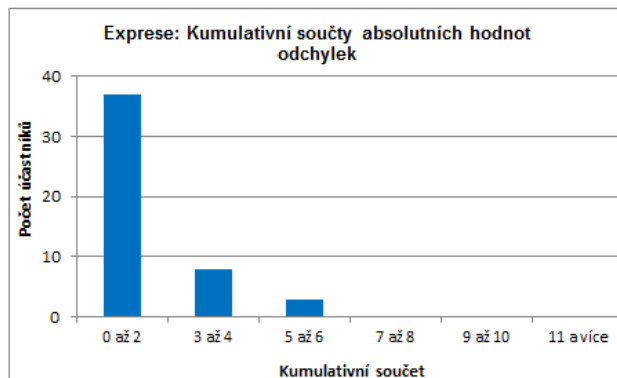
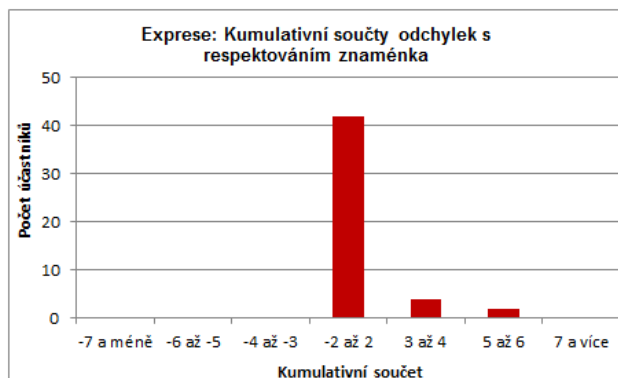
Vysvětlení pojmu: Tyto součty počítáme pouze u **hodnocení exprese účastníky**. Pro každého účastníka se kumulativně sčítají odchylky od vztažných hodnot u vzorků na všech hodnocených pozicích bloku TMA, a to jak s respektováním znaménka (odchylky směrem dolů se znaménkem mínus, odchylky směrem nahoru se znaménkem plus), tak v absolutní hodnotě. Rozdíl mezi hodnocením *negativní (0)* a *negativní (1+)* je počítán jako nulový.

Příklad: laboratoř vyhodnotila vzorek X1 (který měl být hodnocen jako 3+) jako 0 a vzorek X2 (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 pohled na výsledky 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 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.

Vlastní kumulativní součty odchylek (s respektováním znaménka i součty absolutních hodnot) nalezne každý účastník ve svém výsledkovém listu jako součást individuálního komentáře.

Abyste měli srovnání a mohli posoudit, zda se vaše kumulativní součty pohybují v oblasti průměru nebo zda nějakým způsobem vybočují, naleznete na obrázcích níže histogramey těchto odchylek pro všechny účastníky cyklu.



IHC2/21: Imunohistochemie – detekce HER-2/neu**Komplexní pohled na výsledky**

Pro komplexní vyhodnocení toho, jak si laboratoř v EHK vedla, lze použít **6 zdrojů informací, které jsme popsali výše**. Žádný z nich nelze interpretovat osamoceně, ale je třeba zvážit všechny dohromady. Jsou to:

- 1) Vzorek EHK - úspěšnost interpretace
- 2) Vzorek EHK - úspěšnost při hodnocení barvení experty
- 3) Vzorek VKK - úspěšnost při hodnocení experty
- 4) Celková úspěšnost v cyklu (zahrnuje 3 výše uvedené kategorie)
- 5) Součty odchylek od vztažných hodnot (s respektováním znaménka i absolutních hodnot)
- 6) Připomínky expertů (textové poznámky)

Všechny výše uvedené údaje naleznete ve svém výsledkovém listu.

Závěr

Je třeba si uvědomit, že ani opakovaný úspěch v EHK není automatickou zárukou trvalé kvality práce laboratoře. Prosím proto všechny účastníky, aby věnovali 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.

Prosím, 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

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)	Na začátku jsou uvedeny kumulativní součty odchylek jako součást individuálního komentáře. 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). Vzhledem k tomu, že typ použitých vnitřních kontrol se mezi jednotlivými laboratořemi liší, je pouze sumárně ohodnocena kvalita barvení a její interpretace za sklo jako celek, nikoli za jednotlivé dílčí vzorky. Na konci výsledkového listu každý účastník nalezne svou celkovou úspěšnost – tedy kolik procent výsledků zkoušek bylo úspěšných.
Souhrn výsledků - přehled	Zobrazuje souhrn vztažných hodnot, výsledků účastníka a bodů, které získal od expertů, ve formátu, který graficky odpovídá rozložení vzorků v TMA.

Přílohy jsou identifikovány svým názvem, označením cyklu a kódem účastníka a jsou určeny pouze pro potřebu účastníka.

Účastníkům vracíme všechna skla, která nám zaslali.

Další informace

Závěrečná zpráva s výjimkou příloh je veřejná. Jak účastníkům, tak ostatním odborníkům, jsou na adrese www.sekk.cz volně k dispozici další informace, zejména:

- Souhrnný přehled výsledků tohoto cyklu včetně této závěrečné zprávy.
- Dokument **Plán EHK** (obsahuje informace, které se týkají jak tohoto cyklu, tak EHK obecně).
- Vysvětlení obsahu jednotlivých výše uvedených příloh.
- Kontakt na poskytovatele EHK a na koordinátora EHK a seznam všech supervizorů včetně kontaktů.