

VIB1/24: Všeobecná imunohistochemie - barvení

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2024*.

Vzorky

Byly použity vzorky (histologická skla se složenými tkáňovými bloky), které byly připraveny subdodavatelem. 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** (jedině tak mohou získat náhradní sklo 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 provádí tým složený ze 3 expertů. Experti hodnotí **kvalitu barvení** na škále 0 až 2 body pro každé jednotlivé sklo takto:

Počet bodů	Popis	Kritéria
2	Výborné barvení	Barvení bez připomínek ze strany expertů.
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. Je na místě poznamenat, že nulový počet bodů dostávají jen ty preparáty, které dle názoru experta nelze použít v rutinní praxi.

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 neprovedl.

Experti posuzují všechny vzorky anonymně, tj. bez znalosti účastníka, který vzorek zaslal.

Tým expertů	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. MUDr. Helena Hornychová, Ph.D. MUDr. Petra Kašparová, Ph.D.
--------------------	---

Experti si na několika anonymních modelových případech otestovali svá měřítká pro hodnocení a prodiskutovali možné sporné body tak, aby zajistili maximální možnou objektivitu při interpretaci mezi všemi 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:

Součet bodů	Hodnocení	Doporučení
6 nebo 5	Výborný výsledek	Bez připomínek.
4 nebo 3	Akceptovatelný výsledek	Je vhodné barvení zlepšit (barvení není optimální).
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 programu je inspirován systémem NORDIQ, etablovaného evropského poskytovatele EHK pro imunohistochemii. Velmi doporučujeme při výběru primárních protilátek a optimálních protokolů prostudovat tyto stránky: www.nordiqc.org

VIB1/24: Všeobecná imunohistochemie - barvení**Komentář supervizora**

Tohoto cyklu se zúčastnilo 79 pracovišť, z nich 12 ze Slovenska a 1 z Rumunska.

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 až středně silná pozitivita perisinusoidálních buněk jater při detekci hladkosvalového aktinu nebo středně silná pozitivita epitelíí interkalárních vývodů v detekci CK 7.

Výsledky v tomto cyklu byly velmi dobré. Nevyhovující (případně akceptovatelné) výsledky byly většinou podmíněny slabší než očekávanou pozitivitou. Zaznamenali jsme i případy chybné positivity, jež v případě SMA byly velmi četné – viz níže. Každý výsledek v kategorii „akceptovatelný“ by měl být podnětem k optimalizaci metody.

**Někteří účastníci naleznou ve svých výsledkových listech individuální komentáře.
Prosím, věnujte jim pozornost.**

Výsledky účastníků (podrobný přehled včetně počtů výsledků najdete ve statistice na webu):

Vzorek A

TTF-1 (úspěšnost 98 %): Výsledky nevyžadují komentář.

CK 7 (úspěšnost 94 %): Výsledky nevyžadují komentář.

Vzorek B

PRAME (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář.

Inhibin (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář

Vzorek C

SMA (úspěšnost 88 %): Pozorovali jsme systematickou chybu, kdy řada účastníků zaslala preparáty s chybnými pozitivními výsledky. V některých případech šlo pouze o slabé a omezené přibarvování některých struktur (typicky jádra keratinocytů), v mnoha případech šlo o positivity ve všech epitelích, v lymfocytech, fibroblastech atd., a to positivity zejména nukleární, které jsme museli ohodnotit jako výsledky nevyhovující. Tento problém jsme již dříve v rámci cyklů VIB zaznamenali, stejně tak je opakovaně dokumentován v cyklech skandinávského systému externí kontroly kvality NORDIQC (viz odkaz níže). Jejich závěr, učiněný na základě srovnání velkého počtu účastníků, je - stručně - tento: Většinově používaný klon 1A4 v kombinaci s nevhodným protokolem (a to zejména, ale nikoliv výhradně, s přístroji Ventana) vede systematicky k těmto chybným pozitivním výsledkům včetně jaderného barvení. Doporučujeme tedy všem dotčeným laboratořím zvážit úpravu protokolu. Pohledem do výsledků posledního běhu SMA v NORDIQC je zjevné, že nejproblematictější je použití RTU protilátky ve Ventanách, při použití koncentráту (s možností optimalizace titru) jsou výsledky výrazně lepší. Úplná výměna primární protilátky je rovněž možným řešením, jiné klony (zejm. asm-1) mají úspěšnost v NORDIQC vyšší, ale používá je minimum laboratoř, takže hodnocení může být zatíženo chybou malých čísel.

https://www.nordiqc.org/downloads/assessments/134_6.pdf

Desmin (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář.

Vzorek D

MLH1 (úspěšnost 82 %): Jen polovina laboratoř má výsledky optimální, ostatní bez výjimky barví slabě. Na tuto protilátku jsme byli (s přihlédnutím k mimořádnému klinickému významu testování MMR deficiencie) v hodnocení přísnější než na ostatní a jako nevyhovující jsme označovali skla se zjevnou, ale slabou reakcí. Optimální výsledek je kolísající slabá až silná pozitivita všech buněčných jader s výjimkou hepatocytů a dvou MLH-1 deficientních adenokarcinomů. Pozitivita omezená pouze na germinální centra v tonzile svědčí o nízké senzitivitě reakce, kterou považujeme za klinicky nepřijatelnou. Pro srovnání viz NORDIQC:

https://www.nordiqc.org/downloads/assessments/171_81.pdf

Ki 67 (úspěšnost 98 %): Výsledky nevyžadují komentář.

Vzorek E

CD 3 (úspěšnost 98 %): Výsledky nevyžadují komentář.

CD 20 (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář.

LCA (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář.

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 (procento zkoušek, u kterých účastník uvedl správný výsledek). Na dalších 2 řádcích je pak absolutní a relativní počet účastníků, kteří příslušné úspěšnosti dosáhli.

VIB1/24: Všeobecná imunohistochemie - barvení

Úspěšnost		0 %	1 - 74 %	75 - 79 %	80 - 89 %	90 - 94 %	95 - 99 %	100 %
Úspěšnost slovy		nevyhovující		přijatelná	dobrá	velmi dobrá	výborná	
Počet	absolutní	0	1	2	8	14	14	40
	relativní	-	1,3 %	2,5 %	10 %	18 %	18 %	51 %

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

Celková úspěšnost většiny účastníků tohoto cyklu za poslední 2 roky je 80 % nebo vyšší.

Úspěšnost nižší než 80 % je třeba považovat za impuls ke zlepšení.

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:

Název přílohy	Poznámka
Osvědčení o účasti	Dostávají účastníci, kteří splnili podmínky pro jeho vystavení.
Výsledkový list	Dostávají účastníci, kteří uvedli výsledky.

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

Zároveň 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.