

**VIB2/24: 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:

- 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.
- 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** 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.**

<b>Tým expertů</b>	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. MUDr. Daniela Skanderová MUDr. Vladimír Židlík, MBA, MIAC
--------------------	---

Experti si na několika anonymních modelových případech otestovali svá měřítka 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](http://www.nordiqc.org)

**Komentář supervizora**

Tohoto cyklu se zúčastnilo 82 pracovišť, z nich 12 ze Slovenska, 3 z Rumunska a 1 z Polska.

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 hepatocytů při detekci CK AE1/AE3 nebo středně silná pozitivita epitelíí interkalárních vývodů v detekci CK 7 či CDX-2.

**VIB2/24: Všeobecná imunohistochemie - barvení**

Výsledky v tomto cyklu byly horší, než jsme byli v poslední době zvyklí. Nevyhovující (případně akceptovatelné) výsledky byly většinou podmíněny slabší než očekávanou pozitivitou, někdy naopak silným pozadím či dokonce falešným barvením jiných než očekávaných buněk. 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**

**BAP1** (úspěšnost 75 %): Tento marker byl v cyklu zařazen poprvé, z dvanácti laboratoří, které jej barvily, tři neuspěly a další tři uspěly s akceptovatelným, nikoliv optimálním výsledkem. Všechny tyto sub-optimální obrazy byly podmíněny velmi slabou jadernou pozitivitou při současném silném přibarvování cytoplazmy a mezibuněčné matrix. Naopak některé laboratoře zaslaly k hodnocení opravdu krásná skla, takže jsme prostřednictvím SEKKu oslovili jednu z nich a získali jejich svolení publikovat klon použité protilátky – jde o klon/katalogové číslo BAP1 (C-4): sc-28383, kompletní protokol pro platformu Ventana poskytnete na vyžádání supervizor tohoto cyklu (rovněž s laskavým svolením uvedené laboratoře).

**CK AE1/AE3** (úspěšnost 84 %): Nedobré výsledky v tomto velmi rozšířeném barvení jsou překvapující a jdou téměř bez výjimky na vrub slabých pozitivit – ty se projevují nejnápadněji v hepatocytech, kde často nebyla dosažena ani slabá pozitivita a slabě se těmto selhávajícím účastníkům barvila i část ledvinných tubulů, acinární buňky pankreatu a parabasální oblasti v dlaždicovém epitelu tonzily, jde tedy skutečně o problém v barvení, nikoliv o problém jednoho potenciálně nevhodně zvoleného jaterního vzorku. Jen ojediněle se současně se slabým barvením vyskytly i silně se přibarvující lymfocyty.

**Vzorek B**

**SATB2** (úspěšnost 97 %): Výsledky nevyžadují komentář.

**CDX-2** (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář

**CK 20** (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář

**Vzorek C**

**Napsin A** (úspěšnost 84 %): Všechny nevyhovující výsledky jsou podmíněny slabými pozitivitami – projevilo se to zejména na tkáni ledviny, méně i na tkáni plicní. Několik účastníků dosáhlo velmi silného falešně pozitivního barvení v buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu.

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

**Vzorek D**

**HMB 45** (úspěšnost 99 %): Je zřejmé, že vhodnou kontrolní tkání je dobře vybraný angiomyolipom jakožto „low expresor“, naopak melanom je málo užitečný – většina vykazuje příliš vysokou expresi antigenu, naopak některé melanomy jsou zcela negativní.

**Melan A** (úspěšnost 89 %): Nevyhovující bylo sklo s falešnou silnou pozitivitou v tukové tkáni i v normální ledvině. Akceptovatelné výsledky byly charakterizovány očekávaným, ale slabým barvením. Je zřejmé, že vhodnou kontrolní tkání je dobře vybraný angiomyolipom jakožto „low expresor“, naopak melanom je málo užitečný – většina vykazuje příliš vysokou expresi antigenu, naopak některé melanomy jsou zcela negativní.

**Vzorek E**

**p53** (úspěšnost 95 %): Výsledky nevyžadují komentář.

**ER** (úspěšnost 100 %): Výsledky nevyžadují komentář.

**PAX-8** (úspěšnost 83 %): Většina účastníků zjevně používá protilátku se zkříženou reaktivitou (cross-reactivity) proti dalším proteinům PAX rodiny, což se projevuje zejména silnou pozitivitou v B-lymfoidních buňkách. Toto nelze hodnotit jako neúspěch (není to chyba, je to vlastnost metody), nicméně považujeme za vhodné na to účastníky upozornit, aby v praxi tuto skutečnost měli na paměti. Neúspěšný účastník dokonce dosáhl pěkné positivity pouze v lymfocytech, přičemž tubuly ledviny zůstaly zcela negativní.

**VIB2/24: Všeobecná imunohistochemie - barvení****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.

<b>Úspěšnost</b>		<b>0 %</b>	<b>1 - 74 %</b>	<b>75 - 79 %</b>	<b>80 - 89 %</b>	<b>90 - 94 %</b>	<b>95 - 99 %</b>	<b>100 %</b>
Úspěšnost slovy		nevyhovující		přijatelná	dobrá	velmi dobrá	výborná	
Počet	absolutní	0	3	0	7	21	11	40
	relativní	-	3,7 %	-	8,5 %	26 %	13 %	49 %

*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 90 % nebo vyšší.

Úspěšnost nižší než 90 % 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](mailto:fabian@mou.cz)

**Přílohy**

Jako přílohu této zprávy jednotliví účastníci cyklu dále dostávají:

<b>Název přílohy</b>	<b>Poznámka</b>
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](http://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.