

**Cyklus: IHC2/20 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu**

Tento cyklus byl realizován v souladu s dokumentem *Plán EHK 2020*.

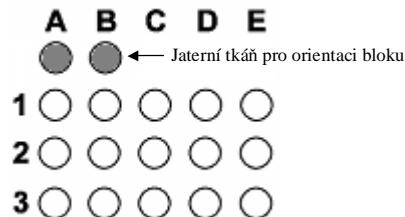
**Vzorky****Vzorky EHK:**

Každý účastník obdržel jedno histologické sklo (TMA). Všechna skla obsahovala shodně uspořádané vzorky z identických zdrojových tkáňových bloků. Mapa bloku TMA je zobrazena vpravo. Zdrojové bloky byly vybrány z případů, které byly předem otestovány imunohistochemicky certifikovaným kitem (Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu) a některé z nich (zejména ty s pozitivitou 2+) i metodou FISH.

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 **exprese HER-2/neu** uvedené účastníky pro jednotlivé pozice TMA.

**Obecná metodika tvorby AV**

Počínaje tímto cyklem jsme vylepšili algoritmus určování AV. Dosud byly AV určovány na pracovišti, které připravovalo vzorky – z pohledu normy ISO 17043 se jedná o AV typu *známá hodnota* (known value, KV). Protože ale existuje celá řada faktorů, které mohou ovlivňovat výsledky účastníků (zejména prostorová heterogenita exprese Her-2 v rámci vzorku), rozšířili jsme na základě doporučení výboru SČP metodiku určování AV ještě o jeden zdroj informace, a tím je konsenzus expertních pracovišť – z pohledu normy ISO 17043 se jedná o AV typu *konsenzus expertů* (consensus from experts, CVE).

**Seznam expertních pracovišť** pro program IHC je k dispozici na webu [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz), tlačítko EHK a odkaz *Expertní pracoviště*. Jedná se o všechny tzv. *Referenční laboratoře* pro Her-2 diagnostiku.

Konsenzus expertních pracovišť (CVE), 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+)

Konečná AV je pak složena ze 2 zdrojů informací (KV a CVE) následujícím postupem:

- Jestliže nedojde ke konsenzu expertů (CVE) nebo není dosaženo shody mezi CVE hodnotou známou z přípravy vzorků (KV), není daná pozice v bloku hodnocena (AV chybí).
- Existuje-li CVE a je ve shodě s KV, pak:
  - Jestliže se experti shodnou na jednom konkrétním výsledku, je tento výsledek označen jako vztažná hodnota a komplementární výsledek z příslušné dvojice (0/1+ a 2+/3+) je označen jako akceptovatelný.
  - Jestliže jsou výsledky expertů v rámci dvojice 0 a 1+ rozprostřeny tak, že se alespoň 80 % neshodne na jedné hodnotě ze dvojice, jsou jako akceptovatelné označeny oba výsledky.

**Výše uvedený postup tvorby AV eliminuje případy, ve kterých by vzorky mohly být označeny jako „neprůkazné“ či „sporné“.**

**AV v tomto cyklu**

Toho cyklu se zúčastnilo 10 expertních pracovišť a AV byly určeny takto - tabulka ukazuje jak výsledky expertních pracovišť a jejich konsenzus (CVE), tak známé hodnoty z výroby vzorků (KV) a finální AV:

Zkouška		Expertní pracoviště				CVE	KV (výroba vzorků)	AV
		Počet výsledků						
		Negativní (0)	Negativní (1+)	Slabě pozitivní (2+)	Silně pozitivní (3+)			
601	A1 exprese HER-2/neu	9	1			0		
602	A2 exprese HER-2/neu				10	3+	3+	
603	A3 exprese HER-2/neu	4	5	1		0, 1+	2+	
606	B1 exprese HER-2/neu	10				0	0	
607	B2 exprese HER-2/neu		6	4		chybí	2+	
608	B3 exprese HER-2/neu	9	1			0	1+	

## Cyklus: IHC2/20 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu

Zkouška	Expertní pracoviště				CVE	KV (výroba vzorků)	AV	
	Počet výsledků							
	Negativní (0)	Negativní (1+)	Slabě pozitivní (2+)	Silně pozitivní (3+)				
611	C1 exprese HER-2/neu			10		2+	2+	2+
612	C2 exprese HER-2/neu	1	7	2		0, 1+	2+	chybí
613	C3 exprese HER-2/neu		2	8		2+	2+	2+
616	D1 exprese HER-2/neu				10	3+	3+	3+
617	D2 exprese HER-2/neu	10				0	1+	0
618	D3 exprese HER-2/neu	10				0	0	0
621	E1 exprese HER-2/neu		4	6		chybí	2+	chybí
622	E2 exprese HER-2/neu	9	1			0	0	0
623	E3 exprese HER-2/neu				10	3+	3+	3+

Tabulka ukazuje, že AV nebylo možné určit na pozicích A3, B2, C2 a E1.

Na těchto pozicích nejsou výsledky exprese, uvedené účastníky, hodnoceny.

## Část 2

Ve druhé části provádí hodnocení tým složený ze 3 expertů. Tento tým hodnotí **kvalitu barvení** prostřednictvím bodování (kde 0 je nejhorší výsledek):

- Na škále 0 až 5 bodů pro jednotlivé pozice TMA vzorku EHK.
- Na škále 0 až 3 body pro vzorek VKK účastníka.

Pokud účastník označí vzorek na některé pozici TMA jako nehodnotitelný - z objektivních důvodů umenšení množství nádorové tkáně ve vzorku - pak se tento vzorek nehodnotí, pokud i experti označí vzorek jako nehodnotitelný (v opačném případě je účastníkům chybějící výsledek hodnocen jako chybný).

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.

<b>Tým expertů</b>	MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. doc. MUDr. Zdeněk Kinkor, Ph.D. MUDr. Dušan Žiak
--------------------	--

Bodová hodnocení pro jednotlivé vzorky (pozice TMA) se od jednotlivých expertů sčítají, součty tedy mohou dosáhnout 0 až 15 bodů pro sklo EHK a 0 až 9 bodů pro sklo VKK. Dosažené součty bodů jsou následně hodnoceny takto:

	Vzorek EHK	Vzorek VKK
Výborný výsledek	13 až 15 bodů	8 a 9 bodů
Akceptovatelný výsledek	8 až 12 bodů	5 až 7 bodů
Nevyhovující výsledek	0 až 7 bodů	0 až 4 body

Výsledek účastníka je celkově hodnocen jako **úspěšný** jestliže je „výborný“ nebo „akceptovatelný“.

**Bodové hodnocení expertů se neprovádí u vzorků (pozic), kde nebylo možné určit AV pro expresi HER-2/neu** (viz výše v oddíle Část 1).

## 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. Nezřídka 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 známky příliš agresivního demaskování epitopů („převažené“), s nespécifickým přibarvováním pozadí, apod.

## Komentář supervizora

Tohoto cyklu se zúčastnilo 46 laboratoří, z toho 10 ze Slovenska a 1 z Maďarska.

## Vzorky EHK

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

## Negativní a silně pozitivní vzorky

Případy, kdy by laboratoř produkovala chybně pozitivní výsledky, se objevují zcela ojediněle. Tedy prakticky všechny negativní vzorky byly interpretovány správně jako negativní (rozdíl mezi 0 a 1+ není podstatný a není nijak penalizován při hodnocení).

Rovněž interpretace silně pozitivních (3+) vzorků nečiní účastníkům potíže.

Pokud by tedy složený blok obsahoval jen vzorky s těmito dvěma stupni exprese, byly by výsledky výborné. Většina laboratoří dobře barví a hodnotí jak vzorky negativní (0/1+), tak vzorky pozitivní (3+).

## Slabě pozitivní vzorky

Slabě pozitivní (2+) vzorky byly umístěny na 6 pozicích A3, B2, C1, C2, C3 a E1, avšak jen na 2 pozicích (C1 a C3) se podařilo určit AV (zbylé 4 pozice nebyly hodnoceny – viz podrobně výše). U těchto 2 vzorků byly výsledky účastníků následující:

- C1: 93 % účastníků jej hodnotilo jako 2+
- C3: 74 % účastníků jej hodnotilo jako 2+

Dokonce ani při použití stejné metodiky, jaká byla použita při přípravě vzorků, nebylo u vzorků s prokázanou amplifikací genu Her-2 mezi účastníky dosaženo shody. Například u vzorku C3 použilo kit *Ventana PATHWAY anti-HER-2/neu* celkem 24 účastníků a ti uvedli výsledky: 1x negativní (0), 7x negativní (1+) a 16x pozitivní (2+).

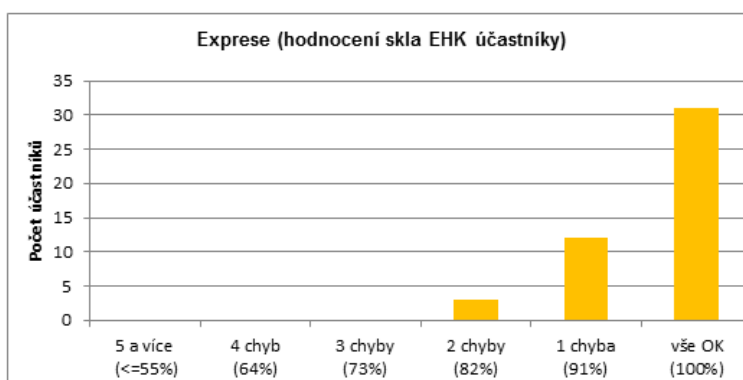
Jako dobrou zprávu lze vnímat to, že hodnocení těchto „problematických“ vzorků laboratořemi a experty se zásadně neliší – nahlédněte do tabulky výše, kde jsou uvedeny počty výsledků expertních pracovišť.

**Opakovaně tedy registrujeme problém v dostatečné citlivosti detekce případů 2+. V uvedených vzorcích s prokázanou amplifikací genu Her-2 by v klinické praxi došlo k poškození pacientky.**

Opakovaně se vyskytujícím problémem jsou jisté technické nedostatky při zpracování vzorků. U vzorků EHK 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) 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.

Celkové rozložení úspěšnosti pro interpretaci 11 vzorků TMA účastníky ukazuje obrázek vpravo.

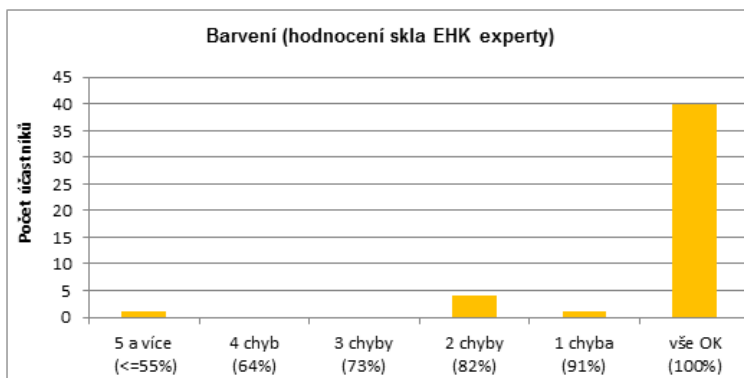
31 účastníků dosáhlo úspěšnosti 100 %,  
12 účastníků dosáhlo úspěšnosti 91 %  
(tj. 1 chyba) atd.



**Cyklus: IHC2/20 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu**

Celkové rozložení úspěšnosti pro **hodnocení barvení 11 vzorků TMA experty** ukazuje obrázek vpravo.

40 účastníků dosáhlo úspěšnosti 100 %,  
1 účastník dosáhl 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.

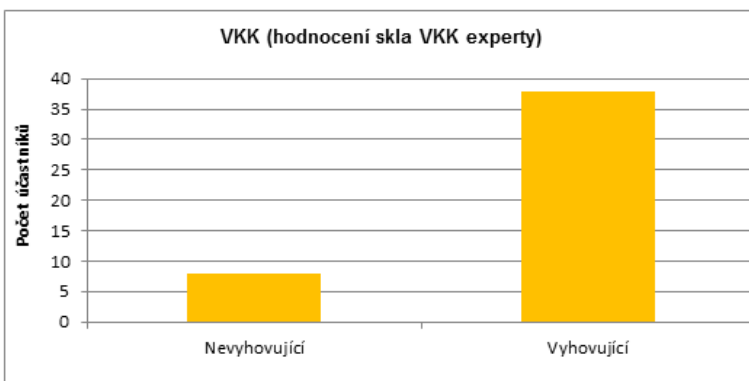
Obecně jsme hodnotili kvalitu vlastních kontrol velké části účastníků jako vyhovující, téměř všichni používají složené tkáňové bloky (tissue arrays) s intenzitami 0/1+/2+/3+. Zcela vymizelo používání vzorků z jehlových biopsií.

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

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

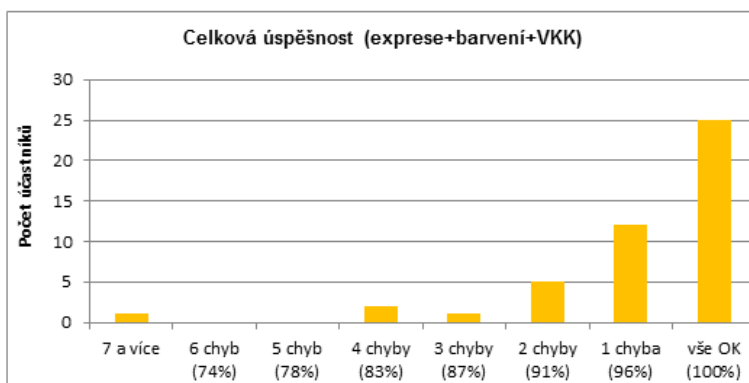
Uspělo 38 účastníků (tj. 83 %).

Jako nevyhovující označili skla VKK experti u 8 účastníků (tj. 17 %).

**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.

**Cyklus: IHC2/20 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu**

*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  $3+2 = 5$ .*

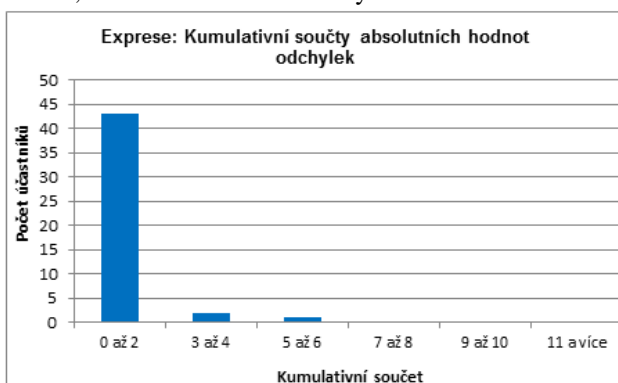
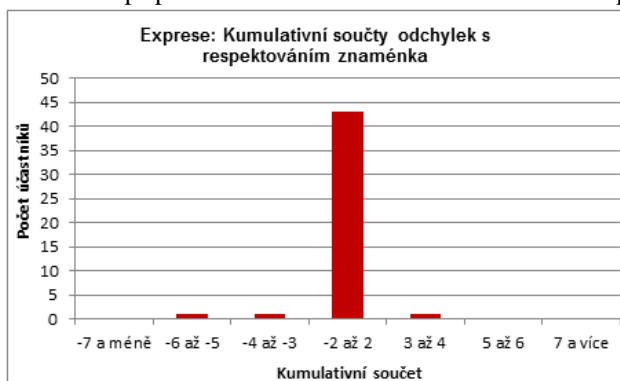
Tento pohled na výsledky dokáže identifikovat laboratoře, které spíše nadhodnocují (součet odchylek s respektováním znaménka je kladný), spíše podhodnocují (součet odchylek s respektováním znaménka je záporný) i takové, které mají zcela nekonzistentní výsledky interpretace (a zpravidla i barvení) – součet 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 zjistit, zda se vaše kumulativní součty pohybují v oblasti průměru nebo zda nějakým způsobem vybočují, naleznete na obrázcích níže histogramy těchto odchylek pro všechny účastníky cyklu.

Jak je vidět v grafech níže, součet odchylek od vztažných hodnot:

- s respektováním znaménka dosáhl -5 a méně u 1 laboratoře, zatímco u 43 účastníků byl v intervalu -2 až +2.
- v případě absolutních hodnot dosáhl 5 a víc u 1 pracoviště, zatímco u 43 účastníků byl maximálně 2.

**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) Přípomínky expertů (textové poznámky)

Všechny výše uvedené údaje naleznete ve svém výsledkovém listu.

**Závěr**

Je třeba si ale 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](mailto:fabian@mou.cz)

**Cyklus: IHC2/20 - Imunohistochemie – detekce HER-2/neu****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 (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 <b>AI exprese HER-2/neu</b> 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 <b>AI barvení vzorku</b> atd.). I zde můžete porovnat své výsledky s anonymizovanými výsledky (počty bodů) ostatních účastníků. c) Bodové hodnocení vlastního kontrolního preparátu (zkouška označená <b>VKK</b> ). 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](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.