

*Сазонов С.В.<sup>1,2</sup>*

## Организация системы внешнего контроля качества иммуногистохимической диагностики рака молочной железы в Уральском федеральном округе (референс)

1 – ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий; 2 – ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Екатеринбург

*Sazonov S.V.*

### Organization of systems for reviewing the material of patients with carcinoma of the breast (reference)

#### Резюме

Система внешнего контроля качества дает возможность объективно оценить результаты работы разных лабораторий, определить причину выявленных несоответствий и дать рекомендации по их устранению. Не менее важным является возможность реализации механизмов обучения персонала патоморфологической лаборатории, участвующей в системе референса материала, стандартизации используемых методических приемов проведения исследований и интерпретации получаемых результатов.

**Ключевые слова:** иммуногистохимические исследования, референс-исследования, рак молочной железы

#### Summary

External quality control system gives the opportunity to objectively evaluate the results of different laboratories, determine the cause of the identified discrepancies and make recommendations to address them. Not less important is the possibility of implementing the mechanisms, personnel training pathomorphological laboratory participating in the system reference material used standardization of teaching methods and research, and interpret the results obtained.

**Key words:** immunohistochemical studies, reference research, breast cancer

#### Введение

Доступность и качество является сегодня одним из основных принципов оказания медицинской помощи (Федеральный закон от 23 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»). Качество оказания медицинской помощи согласно статье 2 этого же закона определено как совокупность характеристик, отражающих своевременность оказания медицинской помощи, правильность выбора методов диагностики и лечения, степень достижения запланированного результата.

Выделение нескольких биологических подтипов рака молочной железы (St.Gallen, 2013) при генетическом тестировании или «суррогатном» иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании позволяет онкомаммологу оценивать прогноз заболевания и определять тактику лечения. При этом, сегодня, по сути определена минимальная панель моноклональных антител, необходимых для иммуногистохимического исследования: определение рецепторов Estrogen, Progesterone, HER2 neu и маркера клеточной пролиферации по определению экспрессии в ядрах опухоле-

вых клеток - Ki67 [1]. В связи с этим, а так же с учетом стоимости проводимых диагностики и лечения пациентов раком молочной железы (РМЖ), повышаются требования к качеству проводимых иммуногистохимических исследований, их стандартизации и воспроизводимости в гистологической лаборатории. Появляется необходимость создания системы комплекса мероприятий, направленных на обеспечение качества проводимых исследований.

Первая большая группа мероприятий связана с разработкой и закреплением нормативными документами требований к осуществлению деятельности в патоморфологических лабораториях (лабораториях первого просмотра материала). Сюда относятся: использование стандартизованных процедур обработки материала, использование стандартизованных методов ИГХ исследования, определение минимально достаточного и необходимого перечня используемых отрицательных и положительных контролей, единых стандартизованных критериев оценки результатов проведенных исследований, заполнение универсальных форм протоколов исследования, обучение персонала лабораторий.

Вторая группа мероприятий связана с созданием системы внешнего контроля качества проводимых иммуногистохимических исследований. В первую очередь к ним относятся разработка нормативных документов, регламентирующих организацию и последующую работу региональных референс – лабораторий (лабораторий второго просмотра, пересмотра материала), центральной референс-лаборатории, одной из функций, которых является осуществление контроля за качеством проводимых исследований, источники финансирования их работы. Конкордантность проводимых иммуногистохимических исследований в лаборатории первого просмотра и референс-лаборатории должна составлять не менее 95% с позитивными и негативными случаями, для молекулярно-биологических исследований методом ISH не менее 90%.

Третья группа мероприятий должна быть направлена на исправление несоответствий Стандарта медицинской помощи больным со злокачественными новообразованиями молочной железы 0, I, II, IIIA (Tis, T1-3N0-2M0) стадии (хирургическое лечение) современным требованиям иммуногистохимической диагностики РМЖ, приведение их к минимально необходимому уровню диагностики.

В 2005 г. экспертная группа BHGI (Breast Health Global Initiative) по проблемам рака молочной железы разработала рекомендации по диагностике рака молочной железы (РМЖ) в странах с «ограниченными финансовыми ресурсами системы здравоохранения» [2,3]. Предложенная экспертами схема предоставляет последовательную, методичную основу для совершенствования возможностей диагностики рака молочной железы, в том числе патоморфологических исследований. Эксперты организации пришли к заключению, что перед началом лечения рака молочной железы обязательна патоморфологическая верификация диагноза, основанная на микроскопическом исследовании образцов ткани. Для улучшения качества диагностики при патологии молочной железы было намечено несколько приоритетных направлений, среди них, как основные можно выделить:

1. организация системы обучения патоморфологов;
2. внедрение новых высокотехнологичных (в том числе молекулярно-биологических) методов патоморфологической диагностики в специализированных лечебно-профилактических учреждениях;
3. организация системы референс-лабораторий в патоморфологической службе и внедрение контроля качества проводимых исследований.

## Основные понятия

Система контроля качества в патоморфологии. Качество проводимых медицинских услуг в патоморфологической лаборатории связано с наличием в лаборатории элементов внутреннего и внешнего контроля. Важнейшим элементом внешнего контроля является система пересмотра материала в референс-лаборатории. В мировой практике первая система внешнего контроля качества UKNEQAS была создана в Великобритании в

1985 г., позднее принцип обязательного пересмотра материала опухолей разными патологами и лабораториями стал внедряться и в других странах [4,5]. Внедрение системы референса вплотную приближает Российские патоморфологические лаборатории, участвующие в ней, к созданию в их работе условий, соответствующих требованиям ISO 15189:2003, ГОСТР ИСО-2006 «Медицинские лаборатории. Специальные требования к качеству и компетентности».

Референс – пересмотр патоморфологического материала в лаборатории, имеющей статус референс-лаборатории.

Референс-система - это набор организационных, структурных и финансовых решений, направленных на создание и поддержания механизма пересмотра патоморфологического материала с целью обеспечения качества выполняемых исследований в лабораториях, входящих в эту систему [6].

Лаборатория первого просмотра - это патоморфологическая лаборатория, обеспечивающая диагностику в данном лечебном учреждении и имеющая соответствующую лицензию на данный вид медицинской деятельности. Данная лаборатория обеспечивает объем диагностики в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи и объемом ее финансирования. Обязательным для включения в референс-систему является наличие специальных дополнительных методов исследования и минимальный объем исследований, выполняемых в течение года [6, 7]. В соответствии с основными требованиями, сформулированными в 2010 г ASCO/CAP для обеспечения нормальной организации работы современной патоморфологической лаборатории рекомендуемое минимальное количество исследований в год должно составлять не менее: для иммуногистохимических (ИГХ) исследований – 250 исследований, для FISH – не менее 100 исследований.

Лаборатория второго просмотра - лаборатория, в которой осуществляется пересмотр материала, поступающего из лабораторий первого просмотра. Такая лаборатория должна не только иметь лицензию на осуществление специализированной медицинской помощи по патологической анатомии, но и пройти добровольную процедуру сертификации процессов выполнения патоморфологических (патологоанатомических) исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении в статусе референс-лаборатории, в том числе на выполнение патогистологических, морфометрических, иммуноморфологических и ISH исследований и получить соответствующий Сертификат соответствия. Т.о. в референс-лаборатории должна быть возможность выполнения как иммуногистохимических, так и молекулярно-биологических методов исследования. При этом объемы выполняемых такой лабораторией исследований должны быть не меньшими, чем рекомендуемые ASCO/CAP. Сотрудники референс-лаборатории второго просмотра являются наиболее квалифицированными специалистами в данной области патологической анатомии, занимаются работой по обучению, оказания методической помощи

специалистам лабораторий первого просмотра, входящим в референс-систему [6,5,7].

Центральная референс-лаборатория - лаборатория, в которой осуществляется пересмотр материала, поступающего из региональных референс-лабораторий второго просмотра. Лаборатория имеет лицензию на осуществление специализированной медицинской помощи по патологической анатомии и Сертификат соответствия процессов выполнения патоморфологических (патологоанатомических) исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении в статусе референс-лаборатории, в том числе на выполнение патогистологических, морфометрических, иммуноморфологических и ISH исследований. Сотрудники Центральной референс-лаборатории являются наиболее квалифицированными специалистами в данной области патологической анатомии, активно занимаются научно-исследовательской работой, являются признанными профессиональным сообществом авторитетами, специалистами в данном направлении деятельности, проводят работу по обучению, оказанию консультативной и методической помощи специалистам лабораторий [6,7]. Референс-лаборатории так же могут проходить контроль качества выполняемых иммуногистохимических и молекулярно-биологических исследований и в независимых референс-центрах, созданных при крупных профессиональных сообществах врачей-патологов. Так с 2013 г. все референс-лаборатории, участвующие в HER2 тестировании рака молочной железы в Российской Федерации для оценки качества получаемых препаратов и правильности их оценки проходят экспертизу в Европейской референс-лаборатории Nordic (Дания) [8].

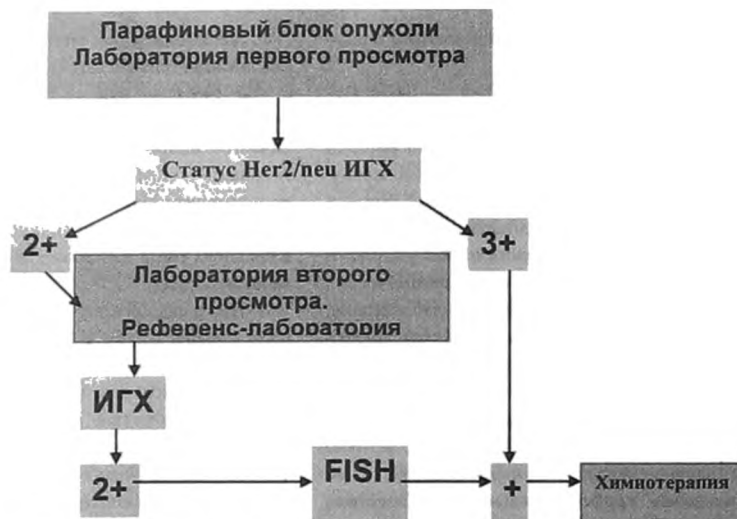
Основные принципы организация работы системы пересмотра материала РМЖ в Уральском федеральном округе (референс)

Лаборатория пересмотра (референс-лаборатория) создается на базе патоморфологической лаборатории, обладающей в своем арсенале двумя специальными методами исследования: иммуногистохимическим (метод позволяет определять уровень экспрессии рецептора в ядрах или на поверхности мембран опухолевых клеток) и *in situ hybridization* (ISH- молекулярно-генетический метод, позволяющий определять наличие амплификации мутантного гена в ядре опухолевой клетки). ИГХ метод нашел широкое применение в связи с тем, что повседневно используется для оценки экспрессии многих других протеинов и может быть выполнен на срезах парафиновых блоков ткани, фиксированной формалином. При несомненных достоинствах ИГХ-метода, а именно легкой воспроизводимости и относительной дешевизне, он имеет и некоторые недостатки. Возможны ложнопозитивные результаты, обусловленные техническим несовершенством метода. Кроме того, гиперэкспрессия Her2/neu может быть и несвязанной с амплификацией гена. Возможны и ложноотрицательные результаты теста. В некоторых случаях, после заливки в парафин, ткани РМЖ, могут терять рецепторы на поверхности мембраны и утрачивать способность давать специфическое окрашивание при проведении ИГХ-исследования [6,9].

Более надежным методом выявления наличия амплификации гена является флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) — золотой стандарт в диагностике Her2/neu-позитивных РМЖ [10]. Метод позволяет оценить количество копий гена в клетке, а более совершенный его вариант — определить количество хромосом 17. Считается, что результат теста является положительным, если соотношение среднего количества копий гена Her2/neu и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке превышает 2,2 [11].

При должной стандартизации методик данные ИГХ-исследования как при Her2/neu-негативном (категории 0 и 1+), так и Her2/neu-позитивном РМЖ (категория 3+) подтверждаются результатами FISH. В лаборатории LabCorp соответствие результатов двух методов отмечали у 89% проанализированных пациентов [9,12,13]. У 4% больных Her2/neu-позитивность по результатам ИГХ-исследования (категория 3+) не подтвердилась результатами FISH [14]. Приемлемой для стандартизованной лаборатории считается 5% частота ложнонегативных результатов. Лабораториям рекомендуется проводить параллельную оценку статуса Her2/neu с использованием ИГХ-метода и FISH до тех пор, пока у менее 5% пациенток, относящихся по данным ИГХ-исследования к категории 0/1+, результаты окажутся позитивными при проведении FISH-теста [15].

Существенную проблему составляют случаи РМЖ, относящиеся к категории сомнительных (неоднозначных) по данным ИГХ-исследования (категория 2+). В 15% случаев десять и более процентов клеток инвазивного рака демонстрируют полное, однако неравномерное окрашивание мембран очевидного радиального характера. Очень редко отмечают вариант интенсивного окрашивания всей мембраны в 10 и менее процентах опухолевых клеток. Эти случаи относят к категории 2+, а результат расценивают как неоднозначный. Проведенные крупные многоцентровые исследования продемонстрировали, что только в части случаев (от 12 до 24%), относящихся к категории 2+, при FISH выявляется амплификация гена и они являются в действительности Her2/neu-позитивными, что делает необходимым проведение исследования РМЖ в два этапа [9,12,16]. Учитывая, что молекулярно-генетические исследования в настоящее время доступны немногим патоморфологическим лабораториям, референс осуществляется в соответствии со следующим алгоритмом: на первом этапе в лаборатории первого просмотра проводится скрининг с использованием ИГХ-метода: ИГХ 3+ случаи рассматривают как позитивные, ИГХ 0/1+ как негативные. В отношении Her2/neu 2+ случаев проводится повторное тестирование в региональной референс-лаборатории с использованием метода ИГХ, при подтверждении результата с использованием метода FISH, позволяющего оценить количество копий гена Her2/neu и наличие полисомии по хромосоме 17 (рис.1). Только при наличии заключения из референс-лаборатории решается вопрос о назначении пациентки химиотерапии.



**Рис.1. Схема проведения молекулярно-биологических исследований рака молочной железы в первичной и референс-лаборатории.**

В работе по проведению референсных исследований определения гиперэкспрессии HER2/нео в 2014г. принимает участие 11 патоморфологических лабораторий учреждений здравоохранения УрФО [17]:

1. референс-лаборатория УрФО - лаборатория патоморфологии ГАУЗ СО ИМКТ, г. Екатеринбург, Свердловская область

2. ГБУЗ ЧОКОД, патологоанатомическое отделение, г. Челябинск, Челябинская область – субреференсная лаборатория

3. ГБУЗ ЧОПАБ, лаборатория иммуногистохимии, г. Челябинск, Челябинская область

4. ГБУЗ СОПАБ, лаборатория иммуногистохимии, г. Екатеринбург, Свердловская область

5. ГБУЗ СООД, патоморфологическое отделение, г. Екатеринбург, Свердловская область

6. ГБУЗ СО ООД №2, патологоанатомическое отделение, г. Нижний Тагил, Свердловская область

7. ГБУЗ СО ООД №3, патологоанатомическое отделение, г. Каменск- Уральский, Свердловская область

8. ГБУЗ ТООД, патологоанатомическое отделение, г. Тюмень, Тюменская область

9. ГБУЗ СОКБ, патологоанатомическое отделение, г. Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ.

10. ГБУЗ НОД, патологоанатомическое отделение, г. Нижневартовск, Ханты-Мансийский автономный округ.

11. ГБУЗ ХМОКБ, патологоанатомическое отделение, г. Ханты-Мансийск, Ханты-Мансийский автономный округ.

Для работы в референс-лабораторию поступают готовые парафиновые блоки и стекла с проведенной в лаборатории первого просмотра иммуногистохимической реакцией и результаты исследования. В лечебном учреждении, в котором расположена лаборатория первого просмотра, оформляется информированное согласие

пациентки на проведение исследований с использованием материала опухоли [18]. Референс проводится для каждого случая с неоднозначным уровнем экспрессии HER2 нео 2+ в течении текущего месяца. Кроме того, для первичной лаборатории с объемом ИГХ исследований РМЖ более 250 случаев в год один раз в полгода на референс исследование дополнительно отправляется каждый 20 случай независимо от его результата. Для лаборатории с объемом ИГХ исследований РМЖ менее 250 случаев в год на референс направляется каждый 10 случай. Если лаборатория только начала принимать участие в программе референса, то с первого месяца работы отправляется 100% всего протестированного материала до достижения совпадения (конкордантности) результатов в 95% случаев.

Референс-исследования проводятся на базе референс-лаборатории Уральского федерального округа - лаборатории патоморфологии ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий.

Выявление экспрессии рецепторов Estrogen, Progesterone, Ki67 и HER2 нео в референс-лаборатории осуществляется с использованием автостейнера DAKO (USA). Предварительно гистологические срезы обрабатываются в блоке подготовки материала "LINK DAKO Cytomation». Оценка реакций осуществляется на световом микроскопе "Zeiss Imager M" (Германия).

Молекулярно-биологические исследования по выявлению наличия амплификации гена HER2 нео проводятся на автостейнере Ventana autostainer Benchmark GX (universal staining system, USA) с использованием INFORM HER2 Dual ISH DNA (Ventana) в модификации SISH dual color. Референс препаратов на амплификацию гена HER2 нео проводится в рамках Международного мультицентрового исследования (в соответствии с требованиями протокола "HER2 Screening Program ML 19870) на базе Центральной референс-лаборатории – патомор-

фологической лаборатории кафедры патологической анатомии РМАПО г. Москва (зав. кафедрой: академик РАН, профессор Г.А. Франк).

По результатам проведенных референсных исследований формируется электронная база данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Статистические исследования выполняются с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica 6.0.».

## Заключение

Основные необходимые шаги по улучшению качества проведения иммуногистохимических исследований в лабораториях первого просмотра материала:

1. Необходимо более активное внедрение в работу ИГХ лабораторий, входящих в референс-систему автоматизированного оборудования для проведения исследований;

2. Использование в первичных лабораториях, в референс- и субреференсных лабораториях наборов, рекомендованных для проведения ИГХ на автостейнерах FDA;

3. Создание в ИГХ лабораториях базы контрольных образцов (блоков и стекол ИГХ) тестирования HER 2 с уровнями экспрессии 1+, 2+, 3+;

4. Формирование внутреннего стремления у врачей лаборатории первого просмотра к достижению контрольных цифр распределения уровней экспрессии при проведении HER2 тестирования PMЖ - ориентировочно: при уровне экспрессии 1+ - 10%, 2+ - 10%, 3+ - 16%;

5. В случае несоответствия в лаборатории первого просмотра распределения контрольных значений уровней экспрессии HER2 привлечение для референс HER2 тестирования случаев с уровнем экспрессии 1+.

6. Разработка системы контроля качества работы ИГХ лабораторий первого просмотра и региональной референс-лаборатории.

В работе ИГХ лабораторий, относящихся к референс-системе следует руководствоваться основными положениями, сформулированными ASCO/CAP для современной патоморфологической лаборатории в 2010 г. [19]:

1. Необходимо использование стандартизованных процедур обработки материала;

2. Необходимо использование стандартизованных методов проведения ИГХ исследования;

3. Обязательно необходим внешний контроль качества. Лаборатория должна добиваться не менее чем 95% конкордантности (совпадения) с позитивными и негативными случаями, прошедшими через референс-лабораторию;

4. Для обеспечения нормальной организации работы рекомендуемое для патоморфологической лаборатории количество исследований в год должно составлять не менее: для ИHC - 250 исследований, для FISH - 100 исследований.

5. Применение положительных и отрицательных контролей для каждого исследования.

6. Обязательный тренинг патологов и медицинских технологов.

7. Применение методов автоматизированного анализа и архивирования ИГХ изображений.■

*Сазонов С.В. - д.м.н., профессор, заведующий референс-лабораторией Уральского федерального округа ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, г. Екатеринбург; Адрес для переписки: 620036, г. Екатеринбург, ул. Соболева, 25, тел. 8 (343) 376-98-28, E-mail: Prof.SSazonov@yandex.ru*

## Литература:

1. Сазонов С.В. Иммуногистохимическая диагностика рака молочной железы. LAP: Lambert Academic Publishing; 2013.
2. Anderson B.O., Shyyan R., Eniu A.E., et al. Breast cancer in limited-resource countries: an overview of the Breast Health Global Initiative 2005 guidelines. *Breast J.* 2006; 1 (12): 3-26.
3. Vargas H.I., Vargas M.P., Gonzalez K.D., et al. Diagnosis of palpable breast masses: ultrasound-guided large core biopsy in a multidisciplinary setting. *Am Surg.* 2004; 70: 867-71.
4. Криволапов Ю.А., Пешков М.В., Леенман Е.Е. и др. Первый опыт проведения внешнего контроля качества иммуногистохимических исследований в диагностике лимфопролиферативных заболеваний. *Архив патологии.* 2011; 2 (73): 25-32.
5. Франк Г.А., Мальков П.Г., Междерякова Н.Г. Контроль качества морфологической диагностики опухолей по результатам школы патоморфологии портала Oncology.ru. *Архив патологии.* 2011; 2 (73): 32-5.
6. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт работы референс-лаборатории по HER2/neu карциномы молочной железы в Свердловской области. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2013; 1 (43): 56-60.
7. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы и желудка. Методические рекомендации и атлас. *Архив патологии.* 2013; 2 (75): 64.
8. Vyberg M., Torlakovic E., Seidal T. et al. Nordic immunohistochemical quality control. *Croat. Med. J.* 2005; 46: 368-71.
9. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 783-92.
10. Ma Y., Lespagnard L., Durbecq V., et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4393-9.
11. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al.

- American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007; 131: 18-43.
12. Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D., et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* 1997; 17: 2639-48.
  13. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 719-26.
  14. Reddy J.C., Reimann J.D., Anderson S.M., et al. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin. Breast Cancer.* 2006; 7: 153-7.
  15. Zarbo R.J., Hammond M.E. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003; 127: 549-53.
  16. Perez E.A., Roche P.C., Jenkins R.B., et al. HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin. Proc.* 2002; 77: 148-54.
  17. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Ситулина О.О. Схема пересмотра материала (референс) больных с раком молочной железы. Патент RUS 80506 07.02.2011.
  18. Солоницына Л.А., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Обеспечение прав пациентов на информацию и ее защиту при проведении референс-исследований карциномы молочной железы. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2013; 1 (43): 15-7.
  19. Франк Г.А., Андреева Ю.Ю., Виноградов И.Ю., Глатко С.Б., Горелик М.З., Завалишина Л.Э., Леенман Е.Е., Мационис А.Э., Петров С.В., Сазонов С.В. 10 лет тестирования HER2-статуса рака молочной железы в России. *Архив патологии.* 2012. 5 (74): 3-6.