

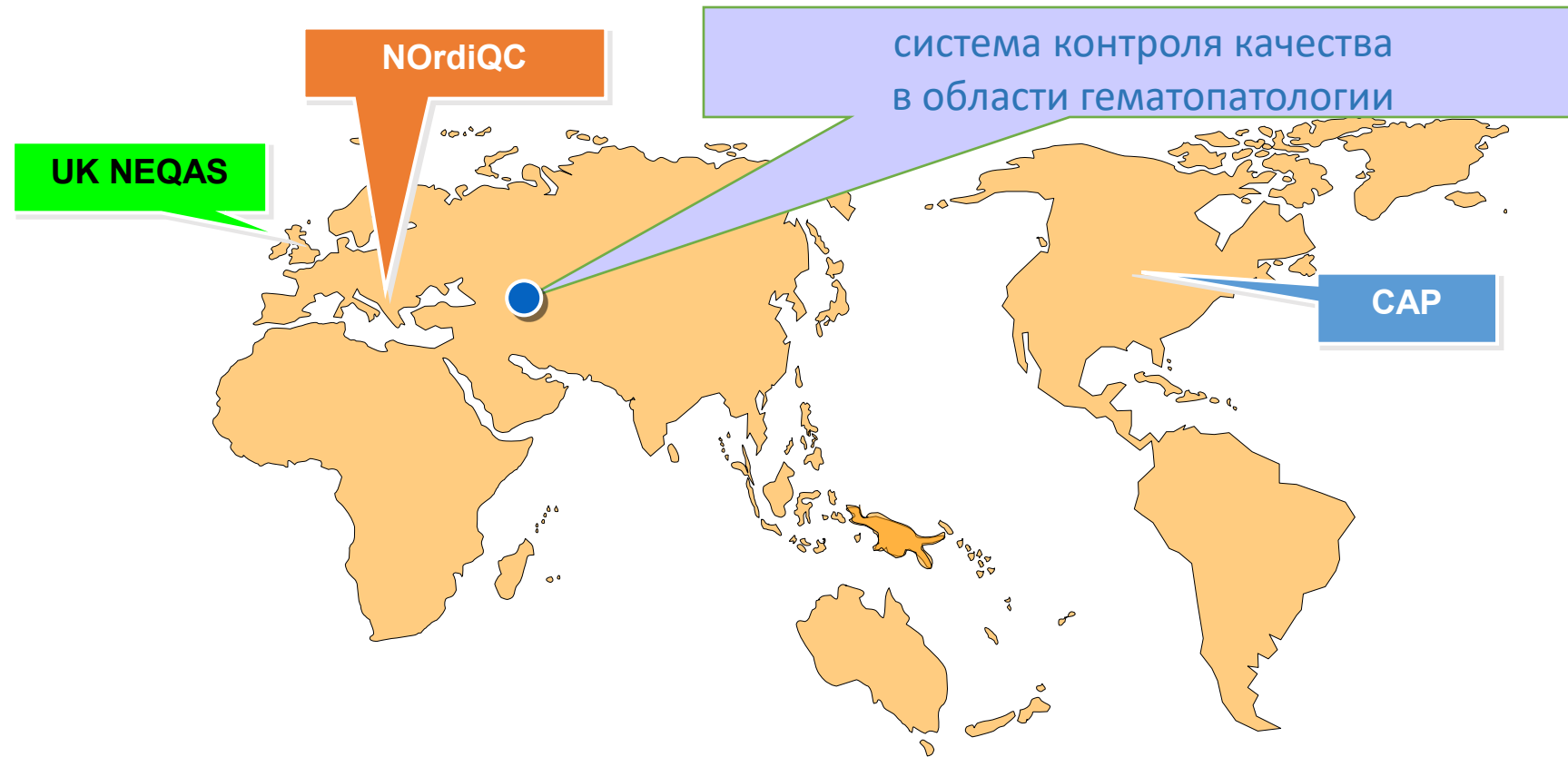


Российская добровольная система контроля
качества патоморфологической и
иммуногистохимической диагностики в
области гематопатологии
Итоги V этапа

При поддержке биотехнологической инновационной компании «Биокад»



Российская добровольная система контроля качества патоморфологической и иммуногистохимической диагностики в области гематопатологии 2009-2024гг.



Практически в каждой стране есть система контроля качества ИГХ-диагностики по отдельным разделам онкопатологии

 Российская Федерация

**Лаборатории-участницы V этапа 2021-2024гг.
контроля качества по гематопатологии**

1 С-Пб ГМУ Санкт-Петербург	АКОД Архангельск	АНО РЦВМТ Новосибирск	ГКБ №40 ДЗМ Москва
ЕМЦ Москва	ККБ-1 Краснодар	ККОД Кемерово	ККОД Краснодар
МКМЦ Медицинский город Тюмень	НМИЦ Гематологии Москва	НМИЦ РОИ Ростов-на-Дону	НЦКМД Санкт-Петербург
ОД Армавир	ОД Смоленск	ОДКБ Екатеринбург	ОКБ Ханты-Мансийск
ОКБ Калининград	ОКОД Астрахань	ОПАБ Челябинск	ПАБ Красноярск
ПАБ Таганрог	РКОД Ижевск	РКОД Казань	СОКОД Смоленск
СККОД Ставрополь			

V этап Контроля качества в области гематопатологии

Цель: улучшить качество патологоанатомической диагностики онкогематологических и гематологических заболеваний

Август 2021 г. (анонс V этапа)– окончание работы сентябрь 2024г.

Зарегистрировано для участия 27 лабораторий.

Присланы гистологические и ИГХ-препараты для анализа результатов из 25 лабораторий

В работе V этапа принимали участие 6 экспертов.

Оценены 302 гистологических и иммуногистохимических препарата

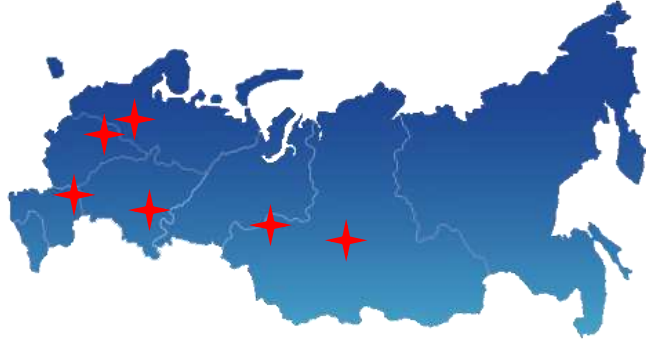
Работа была проведена на срезах с парафиновых блоков биопсийного материала лимфатических узлов с диагнозами:

-нодулярная лимфома Ходжкина с нодулярным ростом, иммуногистохимический вариант - нодули с «В-клеточным истощением»;

-классическая лимфома Ходжкина, NS 2 -го типа, с "классическим" иммунофенотипом;

Разосланы неокрашенные срезы, в каждом случае предлагалось окрасить стекла гематоксилином и эозином, выполнить ИГХ-исследование с антителами к PAX5, CD30, CD20, OCT.2, PD-1 и BOB.1.

Эксперты V этапа контроля качества



Агеева Т. А.

(Новосибирский ГМУ, городской гематологический центр,
Новосибирск)

Байков В. В.

(С-Пб ГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург)

Ковригина А. М.

(ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва)

Петров С. В.

(Республиканский онкологический диспансер, Казань)

Пешков М. В.

(Патолого-анатомическое бюро, Таганрог)

Хоржевский В. А.

(Краевое Патолого-анатомическое Бюро, Красноярск)

Формат V этапа контроля качества

1. Сбор информации о лабораториях, желающих принять участие в проекте
2. Рассылка неокрашенных срезов биопсийного материала с 2-мя нозологиями лабораториям-участницам с сопроводительной документацией
3. Изготовленным гистологическим и иммуногистохимическим препаратам в целях «ослепления» был присвоен порядковый номер лаборатории
4. Направление препаратов для формирования электронного архива
5. Сканирование препаратов и предоставление членам экспертной группы доступа к электронному архиву
6. Оценка препаратов экспертами
7. Анализ результатов



Экспертная оценка проводилась:

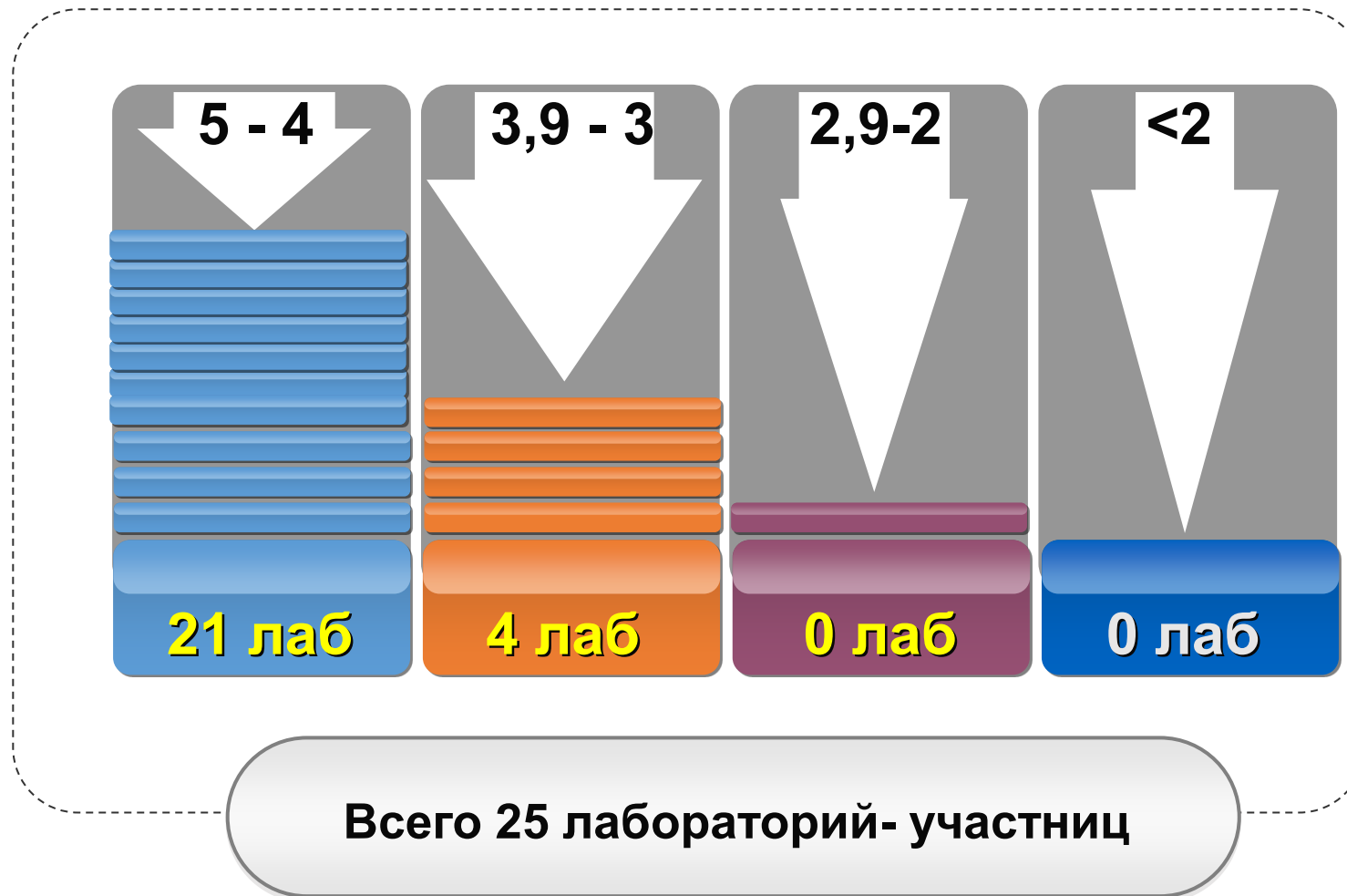
- гистологических препаратов с окраской гематоксилином и эозином;
- иммуногистохимических препаратов с окрашиванием с антителами к CD30, с учетом должной интенсивности клетками реактивного микроокружения, с 3-мя типами положительных реакций при классической лимфоме Ходжкина;
- иммуногистохимических препаратов по экспрессии спектра В-клеточных маркеров, в том числе транскрипционных факторов, с учетом отсутствия фонового окрашивания, ядерной реакции и ее интенсивности в опухолевых клетках, при сопоставлении с В-клетками реактивного микроокружения, что имеет диагностическое значение как для нодулярной ЛХ, так и для классической ЛХ;
- иммуногистохимических препаратов с окрашиванием с антителами к PD-1 с оценкой диагностически значимой иммуногистоархитектоники и адекватной интенсивности мембранной реакции при нодулярной лимфоме Ходжкина

Критерии оценок:

- Каждый препарат/окрашенный срез был оценен по 4-балльной шкале
- 5-отлично/оптимально
- 4-хорошо
- 3-погранично
- 2-плохо

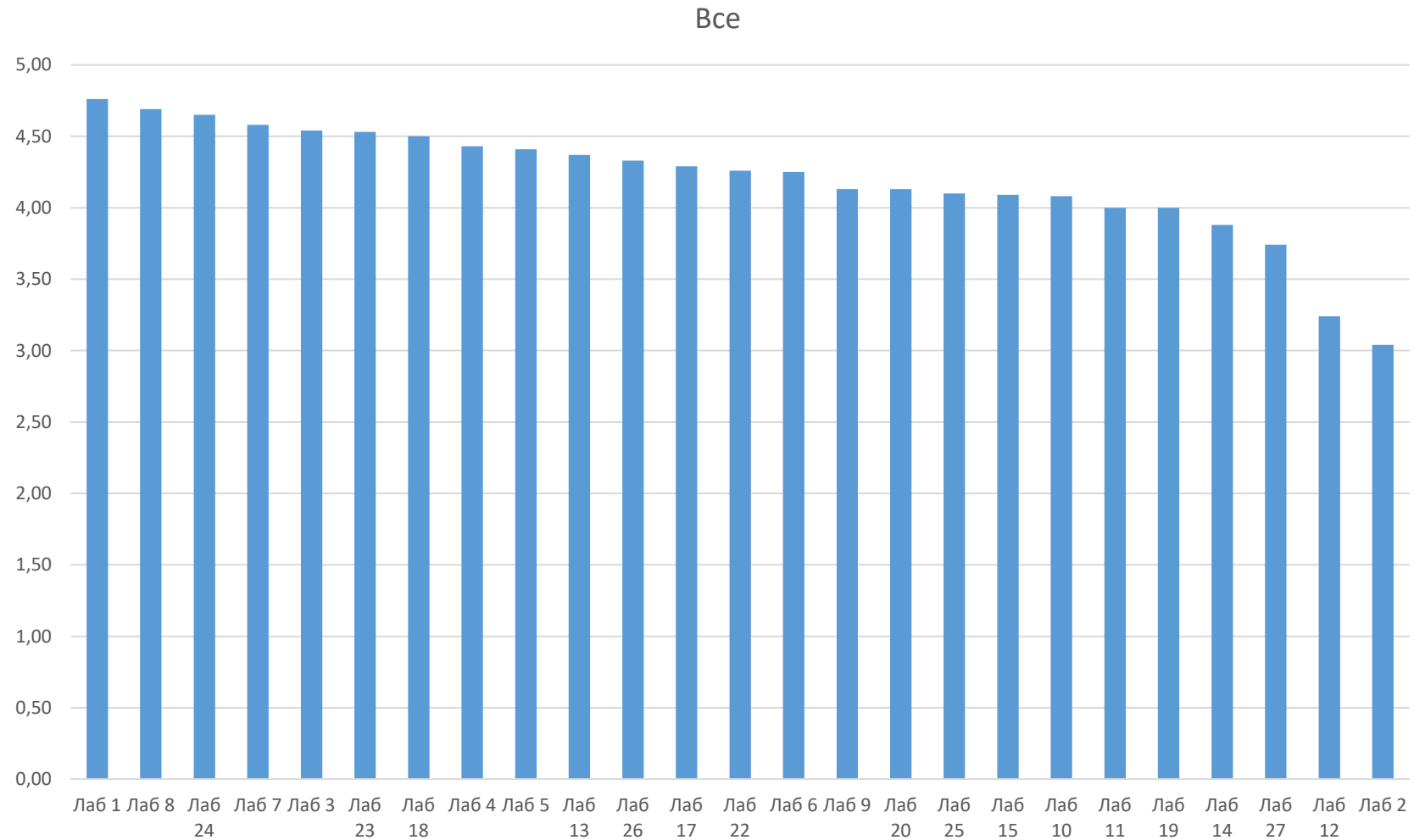
- Критерии:
 - 5 – «отлично или оптимально»– положительная оценка, подразумевающая полное отсутствие недостатков и соответствие принятым стандартам качественного окрашивания
 - 4 – «хорошо» –материал имеет ряд недостатков, не мешающих правильной постановке диагноза.
 - 3 - «погранично» – неудовлетворительная оценка в случае, если затруднительно отличить истинный сигнал от сильного фонового окрашивания, наблюдаются перекрестные реакции, или оценка статуса затруднена из-за качества окрашивания
 - 2 – «плохо» – неудовлетворительная оценка, наблюдаются ложноположительные и/или ложно-отрицательные реакции

V этап контроля качества (2021-2024гг) Общие балльные оценки



Общий рейтинг оценок участников V этапа контроля качества

№	Участник	Все
1	Лаб 1	4,76
8	Лаб 8	4,69
22	Лаб 24	4,65
7	Лаб 7	4,58
3	Лаб 3	4,54
21	Лаб 23	4,53
17	Лаб 18	4,50
4	Лаб 4	4,43
5	Лаб 5	4,41
13	Лаб 13	4,37
24	Лаб 26	4,33
16	Лаб 17	4,29
20	Лаб 22	4,26
6	Лаб 6	4,25
9	Лаб 9	4,13
19	Лаб 20	4,13
23	Лаб 25	4,10
15	Лаб 15	4,09
10	Лаб 10	4,08
11	Лаб 11	4,00
18	Лаб 19	4,00
14	Лаб 14	3,88
25	Лаб 27	3,74
12	Лаб 12	3,24
2	Лаб 2	3,04



Общие рейтинговые оценки 21/25 лабораторий: 4.76 до 3,04 (ниже «4» баллов - 4 лаб)

На оценку влияло в наибольшей степени качество окраски представленных препаратов, чем количество самих препаратов

Множество факторов повлияли на результаты, среди них:

- имеющиеся клоны первичных антител и системы детекции
- подбор условий демаскировки

Несмотря на разнообразие иммуноштейнеров и расходных материалов в разных комбинациях, были получены и отличные оценки, и определены неудовлетворительные результаты

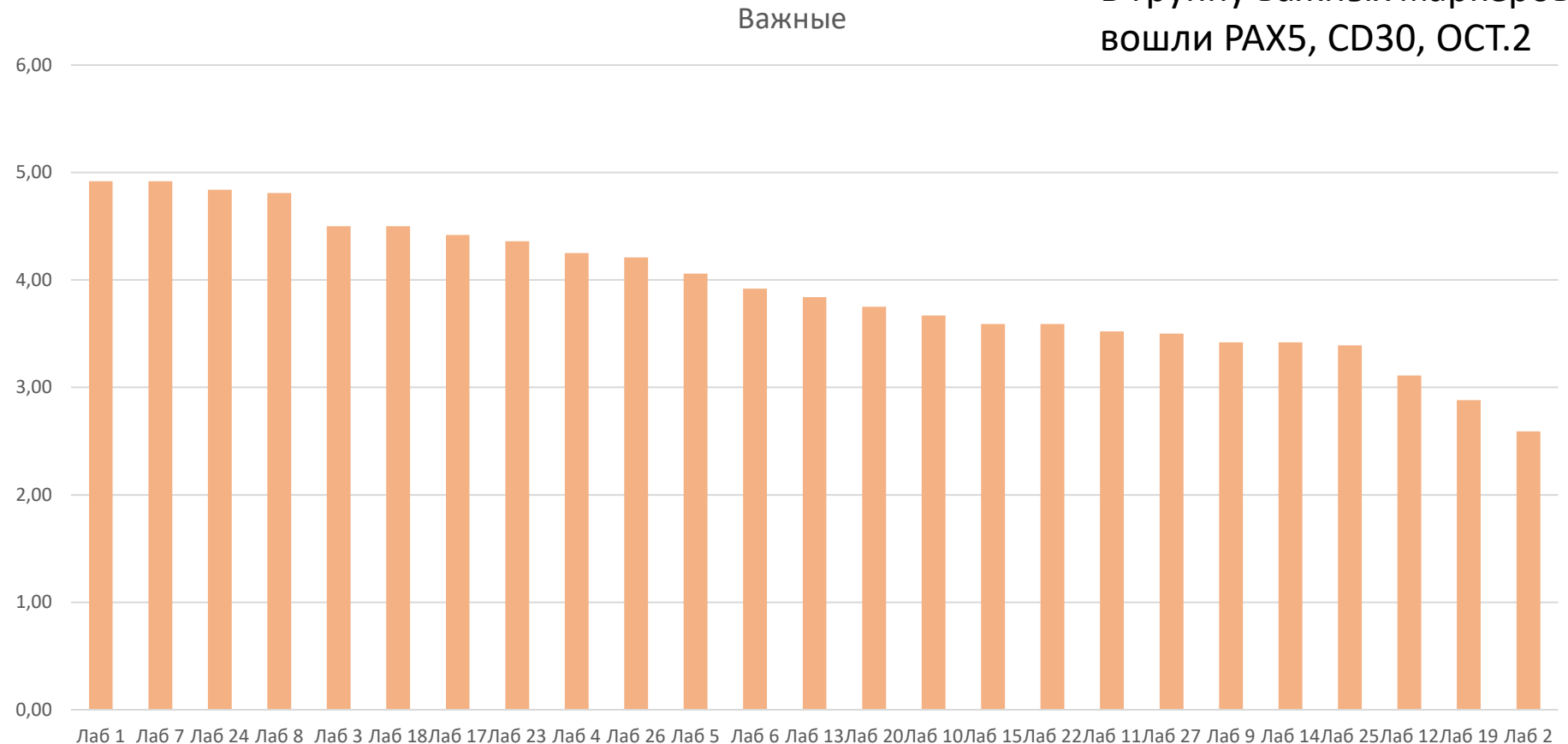
Протоколы демаскировки, используемые лабораториями в V этапе Контроля качества, были проанализированы, и оптимальные были рекомендованы для дальнейшей работы

Рейтинговый лист лабораторий-участниц V этапа

Среднюю оценку по диагностически важным маркерам **от 4 до 5** баллов получили всего **11/25 (44%)** лабораторий.

В группу важных маркеров вошли PAX5, CD30, OCT.2

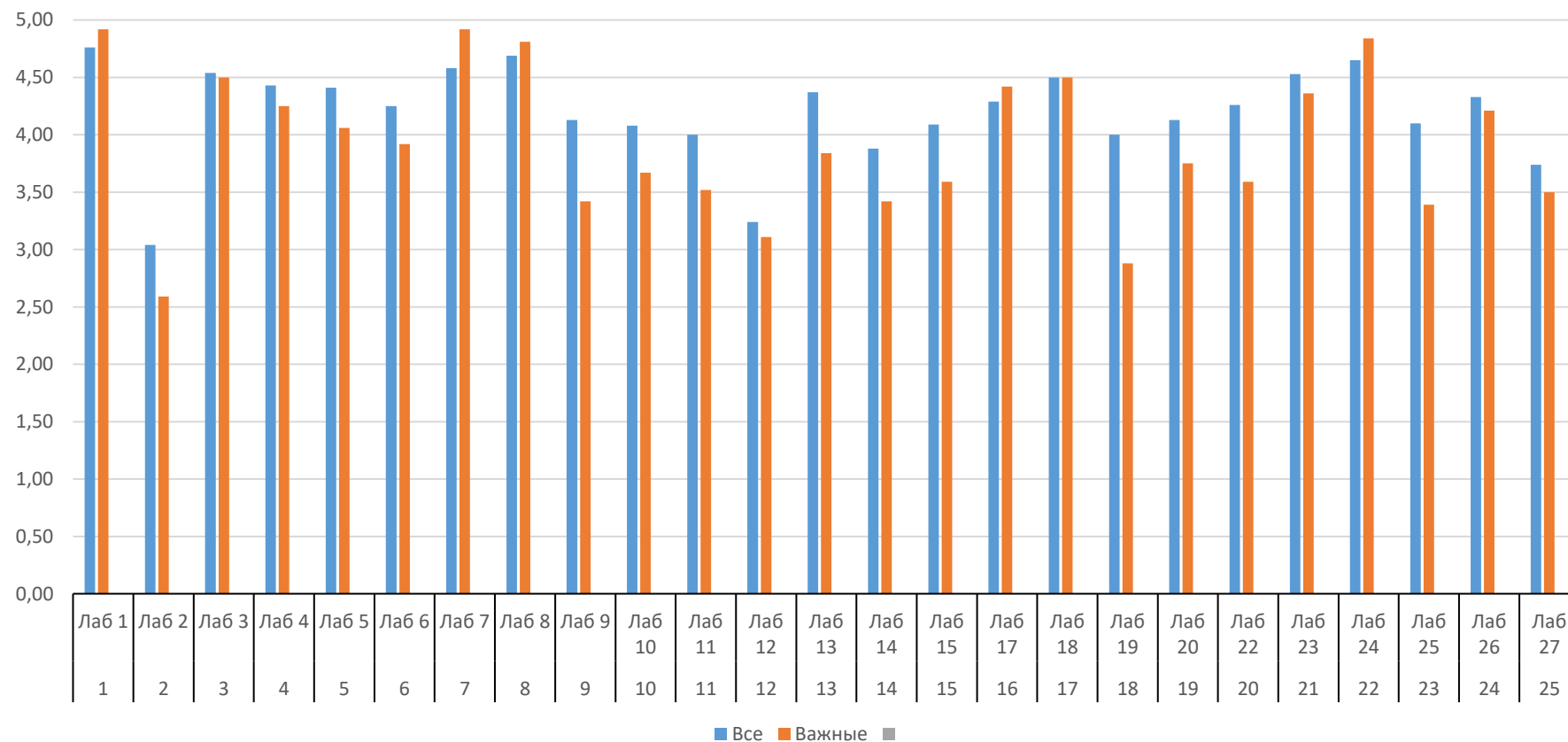
№	Участник	Важные
1	Лаб 1	4,92
7	Лаб 7	4,92
22	Лаб 24	4,84
8	Лаб 8	4,81
3	Лаб 3	4,50
17	Лаб 18	4,50
16	Лаб 17	4,42
21	Лаб 23	4,36
4	Лаб 4	4,25
24	Лаб 26	4,21
5	Лаб 5	4,06
6	Лаб 6	3,92
13	Лаб 13	3,84
19	Лаб 20	3,75
10	Лаб 10	3,67
15	Лаб 15	3,59
20	Лаб 22	3,59
11	Лаб 11	3,52
25	Лаб 27	3,50
9	Лаб 9	3,42
14	Лаб 14	3,42
23	Лаб 25	3,39
12	Лаб 12	3,11
18	Лаб 19	2,88
2	Лаб 2	2,59



Соотношение общих оценок и оценок по диагностически важным маркерам

№	Участник	Все	Важные
1	Лаб 1	4,76	4,92
2	Лаб 2	3,04	2,59
3	Лаб 3	4,54	4,50
4	Лаб 4	4,43	4,25
5	Лаб 5	4,41	4,06
6	Лаб 6	4,25	3,92
7	Лаб 7	4,58	4,92
8	Лаб 8	4,69	4,81
9	Лаб 9	4,13	3,42
10	Лаб 10	4,08	3,67
11	Лаб 11	4,00	3,52
12	Лаб 12	3,24	3,11
13	Лаб 13	4,37	3,84
14	Лаб 14	3,88	3,42
15	Лаб 15	4,09	3,59
16	Лаб 17	4,29	4,42
17	Лаб 18	4,50	4,50
18	Лаб 19	4,00	2,88
19	Лаб 20	4,13	3,75
20	Лаб 22	4,26	3,59
21	Лаб 23	4,53	4,36
22	Лаб 24	4,65	4,84
23	Лаб 25	4,10	3,39
24	Лаб 26	4,33	4,21
25	Лаб 27	3,74	3,50

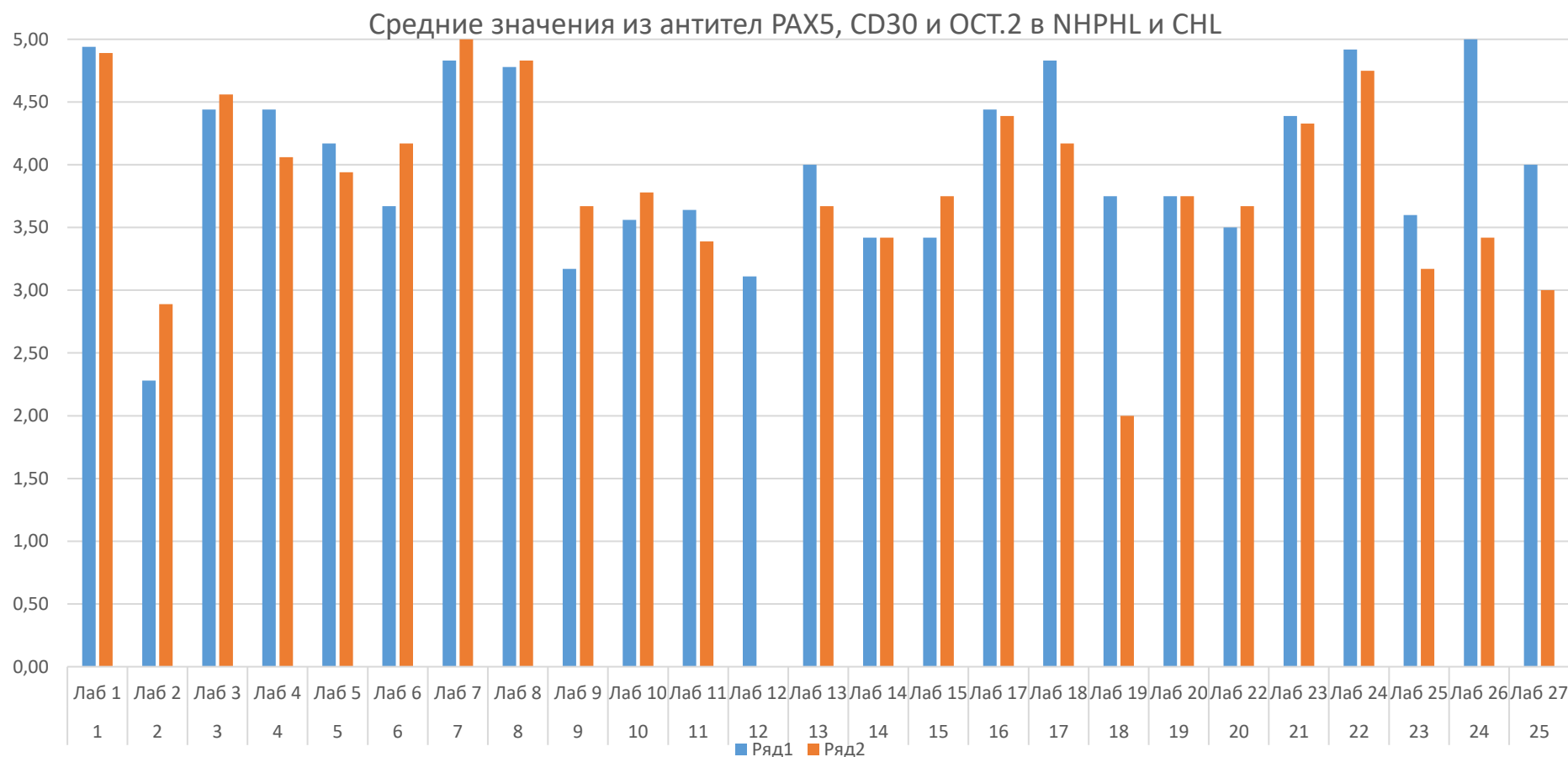
Средние баллы всех антител и диагностически значимых маркеров (РАХ5, CD30, Oct.2)



Сравнение нозологий НЛХЛП (NLRPL) и кл ЛХ (сНЛ)

Сопоставляя результаты окрасок по двум нозологиям лимфомы Ходжкина, балльные оценки по диагностически важным маркерам статистически не различались в одних и тех же лабораториях

Номер	Участник	NLRPL	CHL	Средний балл
1	Лаб 1	4,94	4,89	4,92
2	Лаб 2	2,28	2,89	2,59
3	Лаб 3	4,44	4,56	4,50
4	Лаб 4	4,44	4,06	4,25
5	Лаб 5	4,17	3,94	4,06
6	Лаб 6	3,67	4,17	3,92
7	Лаб 7	4,83	5,00	4,92
8	Лаб 8	4,78	4,83	4,81
9	Лаб 9	3,17	3,67	3,42
10	Лаб 10	3,56	3,78	3,67
11	Лаб 11	3,64	3,39	3,52
12	Лаб 12	3,11		3,11
13	Лаб 13	4,00	3,67	3,84
14	Лаб 14	3,42	3,42	3,42
15	Лаб 15	3,42	3,75	3,59
16	Лаб 17	4,44	4,39	4,42
17	Лаб 18	4,83	4,17	4,50
18	Лаб 19	3,75	2,00	2,88
19	Лаб 20	3,75	3,75	3,75
20	Лаб 22	3,50	3,67	3,59
21	Лаб 23	4,39	4,33	4,36
22	Лаб 24	4,92	4,75	4,84
23	Лаб 25	3,60	3,17	3,39
24	Лаб 26	5,00	3,42	4,21
25	Лаб 27	4,00	3,00	3,50



Рекомендации по условиям демаскировки V и IV этапов (для сравнения): PAX5

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
PAX5	1EW	Leica	RTU	Tris-EDTA	9	100	20	Bond MAX	ds9800 Bc	15min
PAX5	sp34	Cell Marqu	1:150	ЭДТА	9,0	99	20 мин	Bond Max	Bond	30 мин
PAX5	1EW	Bond	RTU	ER1		95		Bond	Бонд поли	15

IV этап

SP34	Ventana	rtu	CC1	8,5	95-99	64	Ventana	UltraView	32
DAK-Pax5	DAKO	rtu	Цитрат	6,1	97	20 мин	PT Link/A	EnVision	20 мин
SP34	LabVisior	01:40	LabVisCy	8.0	98	20 min	PT modul	Quanto	30min
Ncl-pax5	leica	1:30	ER2	9	100	20мин	Bond-Ma	Leica bon	30мин

Рекомендации по условиям демаскировки V и IV этапов (для сравнения): CD20

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
CD20	L26	Leica	1:100	ER1	6	98	32	BOND	Leica	15
CD20	L26	Ventana M	RTU	CC1	8,4	95	36	Ventana B	UltraView	20
CD20	L26	Dako	1 к 150	CC1	9	95	64	Ventana U	Ultra View	40
CD20	L26	Dako	1:400	Цитратный	6,1	98	20 мин	PT-Link	EnVisionFI	30 мин
CD20	L26	Leica	1 ;200	ER 1	6		30	Bond	Bond Poly	8
CD20	L26	Dako	RTU	ER1		95		Bond	Бонд поли	15
CD20	L26	Cell Marqu	1:100	ULTRA CC	Слабощел	Стандарт	30 м	Ventana B	Ultraview	24 м
CD20	L26	Leica	1:200	ЭДТА	9,0	99	20 мин	Bond Max	Bond	30 мин
CD20	MJ1	Leica	RTU	Citrate	6	100	20	Bond Max	ds9800 Bc	15min

IV этап

L26	Dako	RTU	TRS Dako	9	95	20 минут	PT Link	EnVision F	20 минут
L26	DBS	1:50	цитрат	6	98	20 мин	PT-модул	Quanto (T	30 мин
L26	ventana	RTU	cc1	high	95	36	Benchmar	UltraView	16
L26	LabVision	1:400	LabVisCytr	6.0	98	20 min	PT module	quanto	30 min
L26	Cell Marqu	1:300	TRS Dako	9	97	20 мин	PT-link	EnVision F	30

Рекомендации по условиям демаскировки V и IV этапов (для сравнения): CD30

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
CD30	JCM-182	Leica	1:50	ER2	9,0	100	30 мин	BOND MA	Bond Poly	15 мин
CD30	591	Leica	1/100	Tris-буфер	6	37	3ч. 30 мин	XT BENCH	Ultra View	32 мин
CD30	Ber-H2	CELL MAR	RTU	Thermo	9	98	20	PT-модул	HiDefDete	на ночь +8
CD30	Ber-H2	Dako	RTU	Цитратны	6,1	98	20 мин	PT-Link	EnVisionFI	30 мин
CD30	JCM182	Leica	2 к 100	Ultra CC1	9	100	30	Ventana X	Ventana M	32
CD30	Ber-H2	Dako	RTU	ER1		95		Bond	Бонд поли	15

IV этап

BER-H2	DAKO	RTU	DAKO Epit	6,0	97	20 мин	DAKO PT-L	DAKO EnV	30 мин
Ab-1 (Ber-	Lab Vision	1:50	цитрат	6	98	20 мин	PT-модул	Quanto (Te	30 мин
Ber-H2	CellMarqu	1:100	Spring Anti	6.0	98,8	35 мин	водяная б	Spring REV	60 мин
Ber-H2	Cell Marqu	1:100	Trilogy	9	95	20	пароварка	Histofine S	30

Рекомендации по условиям демаскировки V и IV этапов (для сравнения): PD-1

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
PD1	NAT-105	Cell Marqu	1:20	ER2	9,0	100	40 мин	BOND MA	Bond Poly	40 мин
PD1	SP142	abcam	1:400	ER2	9	98	32	BOND	Leica	30
PD1	NAT105	CellMarqu	RTU	CC1	8,4	95	64	Ventana B	OptiView	28
PD1	NAT105	Cell Marqu	1 к 50	CC1	9	100	64	Ventana U	Opti View	32
PD1	MRQ-22	CellMarqu	RTU	Tris/EDTA	9,0	98	20 мин	PT-Link	EnVisionFl	30 мин
PD1	MRQ22	Ventana	RTU	CC1	8,5		24	BenchMar	OptiView	32
PD1	NAT105	Cell Marqu	1:50	ЭДТА	9,0	99	20 мин	Bond Max	Bond	30 мин
PD1	nat105	Cell Marqu	RTU	Tris-EDTA	9	100	20	Bond Max	ds9800 Bc	15min

IV этап

NAT105	cell marqu	RTU	cc1	high	95	36	Benchmar	UltraView	20
NAT105	Cell Marqu	RTU	TRS Dako	9	97	20 мин	PT-link	EnVision F	30

Рекомендации по условиям демаскировки V этапа: OCT.2

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
Oct2	MRQ-2	Cell Marqu	1:20	ER2	9,0	100	40 мин	BOND MA	Bond Poly	15 мин
Oct2	Oct-207	Leica	RTU	ER2	9	98	32	BOND	Leica	15
Oct2	MRQ-2	Cell Marqu	1:20	ER2	9	100	40 мин	BOND MA	Bond Poly	15 мин
Oct2	MRQ-2	CellMarqu	RTU	CC1	8,4	95	64	Ventana B	OptiView	32
Oct2	MRQ2	Cell Marqu	1/200	B ERS2	pH9	99	20мин	Bond-III	Bond poly	15мин
Oct2	Oct-207	Leica	RTU	Tris/EDTA	9,0	98	20 мин	PT-Link	EnVisionFl	30 мин
Oct2	Oct207	Leica	RTU	ER2	9		20	Bond	Bond Poly	8

Рекомендации по условиям демаскировки V этапа: BOB.1

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
Bob1	TG14	Leica	1:10	ER2	9,0	100	20 мин	BOND MA	Bond Poly	40 мин
Bob1	TG14	Leica	1:20	ER1	6	98	32	BOND	Leica	15
Bob1	EP3300	Abcam	1/100	Diluent Ce	7,3-7,7	37 t,оС	2 ч. 58 ми	Ventana B	ultraVIEW	28 мин.

Рекомендации по условиям демаскировки V этапа: CD79α

Антитело	клон	фирма	титр	буфер	pH	t,оС	время	прибор	система	время Ат
CD79α	JCB117	Cell Marqu	1/100	Tris-буфер	7,4	37	3ч. 30 мин	ХТ BENCH	Ultra View	32 мин
CD79α	JCB117	Dako	RTU	Trilogy	6	98	20	PT-модул	HiDefDete	на ночь +8
CD79α	JCB117	Cell Marqu	1:200	CC1		95°C	60 мин	Ventana B	Ulra View	32 мин.
CD79α	SP18	Ventana	RTU	Ultra CC1	9	100	30	Ventana X	Ventana M	16
CD79α	SP18	Ventana	RTU	CC1	8	99	60	Roche-Ver	UltraView	16
CD79α	JCB 117	Dako	RTU	TRS	9	97	20	Link Dako	EnVision F	20
CD79α	TG14	Bond	RTU	ER1		95		Bond	Бонд поли	15
CD79α	HM47/A9	Bond RTU	RTU	ЭДТА	9,0	99	20 мин	Bond Max	Bond	30 мин
CD79α	11E3	Leica	RTU	Tris-EDTA	9	100	20	Bond Max	ds9800 Bc	15min

Окраска гематоксилином и эозином

- вызвала наибольшие трудности у всех участников;
- минимальное количество лабораторий получили оптимальный результат;
- затруднительно проанализировать технологические трудности из-за обилия реагентов и модификаций протоколов в лабораториях

Общие рекомендации по окраске гематоксилином и ЭОЗИНОМ:

- перед любым неспиртовым красителем должна обязательно применяться дистиллированная или деионизированная вода (1-2 мин)
- гематоксилины регрессивные требуют дифференцировки, прогрессивные – нет
- подсинивание прогрессивных гематоксилинов можно выполнять в проточной воде
- чем меньше концентрация кислоты в дифференцирующем растворе, тем дольше удаляется избыток красителя и ядра четче. Концентрация кислоты от 0.25 до 1%; чем меньше концентрация спирта, тем сильнее дифференцирующий раствор
- подсинивание регрессивных гематоксилинов лучше делать в подсинивающих растворах для полного удаления кислоты
- проточная вода до- и после эозина извлекает его избыток из срезов
- последовательность спирт-вода-спирт-вода также извлекает избыток окраски эозином
- спиртовые эозины красят слабее и дольше, водно-спиртовые и водные – быстрее, но труднее извлечь избыток
- после работы ежедневно необходимо фильтровать каждый краситель и доливать свежим до нужного уровня
- смена реагентов для депарафинирования и просветления производится по общим правилам (обычно после каждой 4 партии из 25 стекол меняются реагенты для депарафинирования, начального и окончательного обезвоживания, и дистиллированная вода перед красителями)

Выводы

- В рамках проведения V этапа контроля качества в области гематопатологии 44% лабораторий-участниц имели балльные оценки в диапазоне «4-5 баллов», что свидетельствует в целом о хорошем уровне организации ИГХ-исследования с ежедневным контролем ИГХ-окрашивания примерно у половины лабораторий-участниц
- По результатам V этапа даны рекомендации по протоколам окрашивания гематоксилином и эозином, ИГХ-окрашивания диагностически значимых маркеров для иммуногистохимической верификации диагноза лимфомы Ходжкина (нодулярной лимфоидным преобладанием и классической)



Перспективы



- Стандартизация и повышение качества патологоанатомической диагностики онкогематологических и гематологических заболеваний.
- Улучшение механизмов контроля качества преаналитического, аналитического и диагностического этапов, с учетом накопленного опыта в процессе проведения пяти этапов Российской добровольной системы контроля качества морфологической и иммуногистохимической диагностики онкогематологических заболеваний (2009-2024гг.)
- Совершенствование Российской системы контроля качества патоморфологической и иммуногистохимической диагностики в области гематопатологии на постоянной основе под эгидой Российского общества патологоанатомов, Национального гематологического общества
- Данную работу следует рассматривать как составную часть комплексной системы контроля качества патологоанатомической диагностики в РФ. Использование и тиражирование опыта работы экспертной группы в других областях патологической анатомии

Члены рабочей экспертной группы :

Агеева Т. А. Байков В. В. Ковригина А. М. Петров С. В. Пешков М. В. Хоржевский В. А.