

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Д. Пиневиц

2014 г.

Регистрационный № 040-0514

**МЕТОД ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
ГОРМОНРЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА И HER2/NEU ПРИ РАКЕ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

*Инструкция по применению*

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК:

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

УО «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: к.м.н. Лесничая О.В., Крылов Е.Ю., к.м.н. Дубровский А.Ч.,  
к.м.н. Возмитель М.А.

Витебск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
06.06.2014  
Регистрационный № 040-0514

**МЕТОД ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
ГОРМОНО-РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА И HER2/NEU  
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Витебский государственный медицинский университет», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: канд. мед. наук О.В. Лесничая, Е.Ю. Крылов, канд. мед. наук А.Ч. Дубровский, канд. мед. наук М.А. Возмитель

Витебск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод иммуногистохимического исследования (ИГХ) гормоно-рецепторного статуса и HER2/neu при раке молочной железы (РМЖ).

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь лицам, страдающим раком молочной железы.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Перечень необходимого оборудования:**

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной не более 4 мкм.
2. pH-метр.
3. Термостат.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Баня водяная с датчиком температуры.
6. Микроволновая печь мощностью 750–800 Вт.
7. Световой микроскоп.

### **Реактивы и расходные материалы:**

1. Силанизированные предметные стекла.
2. Покровные стекла.
3. Лабораторная посуда (колбы, пробирки, стеклянные палочки, воронки, стаканы, контейнеры для предметных стекол).
4. Ксилол.
5. 96° этиловый спирт.
6. Водорода пероксид.
7. Tris-HCl — отмывочный буфер, pH 7,5.
8. Цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH 6,0.
9. Буфер для демаскировки антигенов. pH 6,0.
10. Буфер для демаскировки антигенов, pH 9,0.
11. Первичные антитела к рецепторам эстрогена (ER), рецепторам прогестерона (PR), Her-2/neu, Ki-67. Обязательным условием является наличие в спецификации указания на возможность использования на фиксированных формалином тканях человека.
12. Системы визуализации к мышинным и кроличьим антителам или универсальная.
13. Диаминобензидин (DAB).
14. Канадский бальзам.
15. Карандаш для ИГХ.
16. Гематоксилин Майера.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Определение гормоно-рецепторного статуса и степени пролиферативной активности инвазивного рака молочной железы для оценки прогноза и показаний для назначения таргетной терапии трастузумабом.

## ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### Определение экспрессии ER (клон 1D5), PR (клон PgR 636) с указанием этапов (эталон)

Для иммуногистохимического исследования специфичных маркеров необходимо использовать фиксированные в формалине и заключенные в парафин кусочки тканей опухоли, полученные при рутинной патологоанатомической обработке.

#### *I этап. Депарафинирование и обезвоживание*

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в две порции ксилола на 10 мин.
2. Стекла поместить последовательно в три порции этанола 96° на 4 мин.
3. Промыть 3 раза по 2 мин в дистиллированной воде.

*II этап. Предобработка срезов с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин*

1. Поместить срезы в емкость с демаскировочным буфером рН 6,0 и погрузить на 30 мин в водяную баню при  $t = 98^{\circ}\text{C}$ .
2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.
4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.
5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

#### *III этап. Иммуногистохимическая реакция*

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.
2. Нанести неразведенные первичные антитела (анти-ER, анти-PR) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.
3. Слить со срезов жидкость.
4. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
5. Нанести на срезы визуализирующую систему для мышиных антител на 30 мин.
6. Промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.
7. Нанести раствор ДАБ. Приготовить ДАБ в соответствии с рекомендациями изготовителя непосредственно перед нанесением на срезы. Длительность инкубации с ДАБ устанавливается в каждой лаборатории отдельно, для чего необходимо следить за процессом появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели золотисто-коричневый цвет.
8. Слить со срезов жидкость и промыть дистиллированной водой.
9. Срезы докрасить гематоксилином Майера. Время окрашивания зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально (1 мин).
10. Промыть дистиллированной водой.

#### *IV этап. Просветление и заключение срезов*

1. Обезвоживание в спиртах.
2. Просветление в ксилоле.
3. Заключение в канадский бальзам.

Оценка результатов ИГХ окрашивания проводится с применением светового микроскопа. Для всех маркеров необходимо оценивать локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма и/или мембрана), интенсивность пероксидазной метки (в области с максимальной экспрессией) и процент окрашенных клеток.

Результат ИГХ-определения ER и PR представлен в виде окрашенных в коричневый цвет ядер с различной интенсивностью окраски.

Экспрессию рецепторов ER и PR оценивают по балльной системе, изучается интенсивность окраски и доля окрашенных опухолевых клеток.

Процент окрашенных опухолевых клеток оценивается от 0 до 5 баллов; при этом:

- 0 баллов — отсутствие окрашивания;
- 1 балл — количество окрашенных клеток менее 1%;
- 2 балла — количество окрашенных клеток от 1 до 10%;
- 3 балла — количество окрашенных клеток от 11 до 33%;
- 4 балла — количество окрашенных клеток от 34 до 66%;
- 5 баллов — количество окрашенных клеток от 67 до 100%.

Интенсивность окраски оценивается от 0 до 3 баллов, при этом:

- 0 баллов — окраска отсутствует;
- 1 балл — слабая окраска;
- 2 балла — умеренная окраска;
- 3 балла — выраженная интенсивность окраски.

Для получения IRS (immune reactivity SCORE) суммируют баллы доли окрашенных клеток и интенсивности их окраски. Опухоль считают *позитивной* по содержанию ER, PR при суммарном балле более или равном 3 (SCORE), или более 1% окрашенных клеток.

#### **Определение экспрессии Her-2/neu (поликлональные кроличьи антитела)**

##### *I этап. Депарафинирование и обезвоживание*

Аналогично эталону.

*II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин*

1. Поместить срезы в емкость с цитратным буфером для демаскировки антигенов pH 6,0 и обработать в микроволновой печи в течение 12 мин при максимальной мощности 750–800 Вт.

2. После демаскировки оставить емкость со срезами при комнатной температуре на 20 мин.

3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 мин.

4. Поместить срезы в 3% перекись водорода на 20 мин.

5. Промыть в дистиллированной воде 3 раза по 2 мин.

##### *III этап. Иммуногистохимическая реакция*

6. Срезы обвести карандашом для ИГ X.

7. Нанести разведенное (1:900) в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело

(анти-Нег-2/neu) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин. Разведение рекомендуется устанавливать в диапазоне от 1:200 до 1:900 в соответствии с прилагаемой к антителам инструкцией фирмы-производителя и индивидуальными условиями лаборатории.

8. Слить со срезов жидкость.

9. Срезы промыть в Tris-буфере 2 раза по 5 мин.

10. Нанести на срезы визуализирующую систему для кроличьих антител на 30 мин.

Пункты 6–10 выполнять по эталону.

*IV этап. Просветление и заключение срезов*

Аналогично эталону.

Рекомендуются следующие критерии оценки маркера (SCORE):

- опухоль считается *отрицательной по Her-2/neu* при отсутствии мембранного окрашивания или при окрашивании менее 10% клеток;

- опухоль оценивается:

- 1 балл (1+) — при неполном окрашивании мембран у более 10% клеток;

- 2 балла (2+) — при полной умеренно интенсивной окраске мембран у более 10% клеток;

- в 3 балла (3+) — при полном интенсивном окрашивании мембран более 10% клеток.

*Примечание* — при оценке экспрессии Her-2/neu в 2+ по результатам иммуногистохимического окрашивания необходимо определение уровня амплификации гена методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

### **Определение экспрессии Ki-67 (MIB-1)**

*I этап. Депарафинирование и обезвоживание.* Аналогично эталону.

*II этап. Предобработка с целью демаскировки антигенов, направленная на восстановление структуры белка, которая изменилась в ходе фиксации и заливки в парафин.*

Аналогично эталону; для Ki-67 используется демаскировочный буфер pH 6,0.

*III этап. Иммуногистохимическая реакция.*

1. Срезы обвести карандашом для ИГХ.

2. Нанести разведенное 1:25–1:50 в Tris-буфере с 1% БСА первичное антитело (Ki-67) и инкубировать срезы при комнатной температуре 30 мин.

Пункты 3–10 аналогично эталону.

*IV этап. Просветление и заключение срезов.* Аналогично эталону.

### **Критерии оценки маркера Ki-67 (MIB-1)**

Пролиферативная активность опухоли оценивается как процент Ki-67 положительно окрашенных в коричневый цвет ядер в клетках опухоли:

- высокая пролиферативная активность опухоли соответствует экспрессии Ki-67 в более чем 15% клеток;

- низкая пролиферативная активность — экспрессии Ki-67 в менее 15% клеток.

На основании метода, изложенного в настоящей инструкции, можно осуществлять расчет ориентировочной потребности в закупке реактивов для ИГХ и лекарственных средств для таргетной терапии по примеру, приведенному в приложении.

## Расчет ориентировочной потребности в закупке реактивов для ИГХ и лекарственных средств для таргетной терапии на примере Витебской области

Среднее количество женщин с РМЖ в год, выявленных в Витебской области, представлено в таблице.

Таблица — Среднее количество женщин с карциномой молочной железы в год, выявленных в некоторых областях Республики Беларусь за 2002–2012 гг.

Область	Количество женщин на 01.01.2013 (в тыс.)	Среднее количество женщин с вновь выявленным РМЖ ± стандартное отклонение	Процент заболевших женщин
Брестская	738,7	471,2±31	0,06%
Витебская	650,4	485,9±37	0,07%
Гомельская	765	542,4±49	0,07%
Гродненская	565,8	397,8±40	0,07%
Могилевская	571,8	410,4±56	0,07%

Среднее количество вновь выявленных в год случаев РМЖ в каждой области приблизительно одинаково, что может служить основанием для расчета количества необходимых ИГХ реактивов (Her2/neu, рецепторов к эстрогену и прогестерону, Ki-67), предусмотренных алгоритмами диагностики и лечения (методами диагностики, лечения, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь в установленном порядке) пациенток с РМЖ в Республике Беларусь.

При прогнозировании потребности лекарственных средств для таргетной терапии РМЖ трастузумабом следует ориентироваться на количество женщин, у которых иммуногистохимически выявлена гиперэкспрессия Her2/neu (Score3+), что определяет показание к назначению этого лекарственного средства.

Средний процент гиперэкспрессии в 2010–2012 гг. по Витебской области составил 23%, отсюда количество женщин, нуждающихся в таргетной терапии трастузумабом можно прогнозировать следующим образом: среднее количество женщин с вновь выявленным РМЖ умножить на средний процент случаев с установленной ИГХ гиперэкспрессией, например, Витебская область —  $485,9 \times 0,23 = 111,8$  и т. д.