

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

_____ 2014 г.

Регистрационный №

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
АДЕНОКАРЦИНОМ ШЕЙКИ МАТКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение образования

«Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ:

К.м.н., доцент Рогов Ю.И., Юшкевич Н.Н.

Минск, 2014

[Введите текст]

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) разработана с целью совершенствования диагностики аденогенных неоплазий шейки матки для выбора патогенетически обоснованного лечения, путем выявления взаимосвязи между показателями экспрессии иммуногистохимических признаков в различных гистологических типах аденокарцином шейки матки и в доброкачественных опухолевых и псевдоопухолевых железистых патологических процессах, напоминающих аденокарциному в гистологическом материале. Иммуногистохимический метод дополняет и уточняет клинические и микроскопические (светооптические) методы.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, врачей-гинекологов, врачей клинико-лабораторной диагностики.

ПРИМЕНЕНИЕ: онкология, патологическая анатомия, гинекология.

УРОВЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ: патологоанатомические бюро, онкологические диспансеры, молекулярно-генетические лаборатории.

Перечень необходимого оборудования, реагентов расходных материалов

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Микроскоп.
2. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 3 мкм.
3. Холодильник бытовой.
4. Микроволновая печь или водяная баня, либо другой аппарат, предназначенный для поддержания постоянной температуры

- промывочного буфера.
5. Термостат либо термостоллик для сушки стекол.
 6. Вытяжной шкаф.
 7. Таймер.
 8. Пипет-дозаторы в диапазоне от 1 до 1000 мкл.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ:

1. Водоотталкивающий фломастер для ограничения срезов.
2. Стекла предметные для иммуногистохимических исследований Super Frost Plus либо силанизированные.
3. Стекла покровные.
4. Микротомные лезвия одноразовые низкого профиля.
5. Наконечники полимерные одноразовые с фильтрами к дозаторам пипеточным для одноканального дозатора в диапазоне от 1 до 1000 мкл со штативом.
6. Наборы лабораторной посуды.
7. Влажная камера произвольного образца для инкубации стекол.
8. 3%-ный раствор перекиси водорода или блокатор пероксидазы.
9. Гематоксилин Майера или любой краситель для подкрашивания ядер.
10. О-ксилол.
11. Спирт этиловый ректификованный 96°, 100°(этанол).
12. Среда монтирующая на основе полистерола.
13. Демаскирующий буфер: Концентрат TRIS/EDTA (50x) pH6.1 для EnVision Target Retrieval Solution, LowpH (50x).
14. Промывочный буфер 10x /Wash Buffer 10x.
15. Универсальная система визуализации на полимерной основе к

мышинным и кроличьим антителам.

16. Жидкий DAB+ / Субстрат хромогена (Диаминобензидин).
17. Безсывороточная система растворов для устранения неспецифического фонового окрашивания /Protein Blok.
18. Моноклональные мышинные антитела к человеческому белку (Таблица 1).

Таблица 1 – Рекомендуемые мышинные антитела к человеческому белку

<i>№</i>	<i>Название антитела</i>	<i>Клон</i>	<i>Разведение</i>	<i>Положительный контроль</i>
1.	Моноклональные мышинные антитела к человеческому белку p53/Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein	Clone DO-7	1:50	Ткань опухоли молочной железы
2.	Моноклональные мышинные антитела к человеческому белку p16INK4a/Monoclonal Mouse Anti-Human CDKN2A/p16INK4a	Clone 2D9A12	1:1500	Ткань опухоли головного мозга. Ткань опухоли печени

Обязательные требования при выборе первичного антитела: указание в спецификации производителя на возможность использования в диагностических целях (маркировка «for in vitro diagnostic use») на формалин-фиксированном материале (маркировка «for formalin-fixed tissues, parafin embeded»).

Важно! В случае использования других антител условия окраски могут отличаться. Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо одно отрицательное и одно положительное

контрольное окрашивание. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы не покрываются первичным антителом.

Методика окрашивания может отличаться от предложенной в зависимости от условий каждой лаборатории и используемых реагентов.

Показания к применению: аденомы и аденокарциномы, полипы, другие невоспалительные патологические процессы в шейке матки, прогнозирование с учетом использования иммуногистохимических маркеров.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

Описание этапов метода иммуногистохимической диагностики аденокарцином шейки матки

Забор биологического материала

Опухолевую ткань получают во время хирургического вмешательства, в ходе диагностической биопсии. Биологический материал доставляют в лабораторию. Для исследования используется ткань шейки матки, фиксированная 10% раствором нейтрального формалина и заключенная в парафин. Для последующего иммуногистохимического анализа выбирают блок с сохраненной структурой ткани, без некроза и геморрагий. Выбор блока ткани для исследования проводит врач-патологоанатом.

Допускается, при необходимости, применение замороженного тканевого материала, хранившегося при температуре -70°C .

Многократное размораживание биологического материала категорически запрещается!

Примечание: при использовании замороженного тканевого материала, используют антитела с маркировкой «for frozen section».

I этап

Изготовление тканевых срезов

1. На микротоме использованием одноразовых лезвий изготавливают парафиновые срезы толщиной не более 3 мкм.
2. Срезы поместить на предметные стекла с высокой способностью к адгезии.
3. Подсушить на термостолке при температуре не более 45⁰ С. Можно помещать на ночь в термостат при температуре 37⁰ С.
4. Перед термической обработкой стекла инкубировать на термостолке 1 час при 60⁰С.

II этап

Депарафинизация и обезвоживание

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами последовательно в три порции ксилола на 3 минуты в каждый.
2. Стекла поместить последовательно в спирты нисходящей концентрации по 3 минуты каждый:
 - 1) 100%,
 - 2) 96%,
 - 3) 80%,
 - 4) 70%,
 - 5) 60%.
3. Промыть срезы в двух порциях дистиллированной воды по 5 минут каждый.

Важно! По мере загрязнения провести смену реактивов в батарее. **Неполное удаление парафина или ксилола значительно ухудшает результат иммуногистохимической реакции!**

III этап.

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

1. Приготовление буфера для высокотемпературной обработки срезов: концентрат TRiS/EDTA pH6.1 Target Retrieval Solution, LowpH (50x), развести в дистиллированной воде (концентрация 1:50).

2. Высокотемпературная обработка срезов для демаскировки антигена проводится в водяной бане:

1) Срезы поместить в стакан Коплина с предварительно разогретым до 97°C буфером. Оставить инкубироваться на 40 минут.

2) Контейнер со стеклами извлечь из бани, оставить остывать в течение 15-20 минут.

3) Остывшие стекла промыть в проточной водопроводной воде 10 минут.

4) Стекла просушить фильтровальной бумагой, срезы обвести водоотталкивающим фломастером.

5) Затем промыть в промывочном буфере (используется концентрированный «Промывочный буфер»/Wash Buffer в разведении 1:10 в дистиллированной воде) в течение 5 минут.

3. Блокирование эндогенной пероксидазы провести путем обработки срезов 3%-м раствором перекиси водорода в течение 10 минут.

4. Промыть срезы в промывочном буфере 5 минут.

5. Нанести на срезы безсывороточную система для устранения неспецифического фонового окрашивания (Protein Blok).

6. Инкубировать в течение 5 минут при комнатной температуре.

7. Слить протеиновый блок **(не промывая!!!)**.

IV этап.

Проведение иммуногистохимической реакции

1. Развести антитела с применением растворителя антитела (Antibody Diluent).
2. Нанести первичное специфическое антитело в рабочем разведении (Таблица 1).
3. Инкубировать срезы с первичным антителом производится в течение 30 минут при комнатной температуре во влажной камере.
4. Слить со срезов жидкость.
5. Срезы промыть в дистиллированной воде.
6. Промыть срезы в двух сменах промывочного буфера по 5 минут в каждом.
7. Поместить стекла во влажную камеру и нанести на срезы визуализирующую систему, инкубировать при комнатной температуре 30 минут.
8. Промыть срезы в двух сменах промывочного буфера по 5 минут.
9. Непосредственно перед применением приготовить раствор диаминобензидина: на 1 мл субстрата добавить 30 мкл DAB.
10. Окрашивание проводить **в камере с закрытой крышкой** в течение 10 минут (необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом; время окрашивания считается достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели яркий золотисто-коричневый цвет, при отсутствии фонового окрашивания).
11. После окрашивания срезы промыть в промывочном буфере в течение 5 минут, затем в дистиллированной воде в течение 5 минут.

12. Окрасить срезы гематоксилином Майера в течение 1 минуты, при необходимости дифференцировать окраску в солянокислом спирте, промыть в проточной воде.

V этап.

Просветление и заключение срезов

1. Поместить стекла с парафиновыми срезами в 96% этанол: 3 раза по 3 минуты каждый.

2. Поместить стекла с парафиновыми срезами в ксилол: 3 раза по 3 минуты каждый.

3. Срезы заключаются в среду на основе полистерола под покровное стекло.

Оценка результатов иммуногистохимического исследования

Оценка результатов иммуногистохимического окрашивания производится с использованием светового микроскопа.

Рассматривать не менее 5 полей зрения на увеличении микроскопа ×400.

Оценка ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена **p16INK4a** рекомендуется производить по следующей системе:

0 – отсутствие реакции или полное отсутствие окрашивания цитоплазмы и ядер, или выделение его менее чем в 5% клеток эпителиального пласта;

1 – очаговая – слабая реактивность только в ядрах от 5 до 80% клеток, распределенная фокально или диффузно (рисунок 1);

2 – положительная – окрашивание в цитоплазме и ядрах более 80% клеток, распределенного фокально или диффузно (рисунок 2).

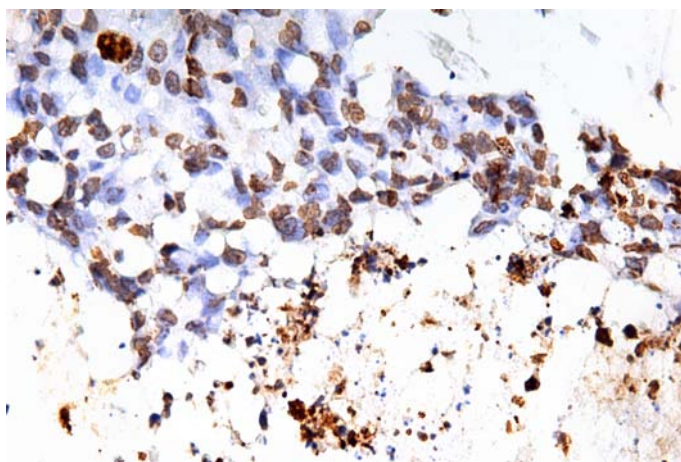


Рисунок 1 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p16INK4 – золотисто-коричневое окрашивание менее 80% ядер железистого эпителия, оцененное как «очаговая».

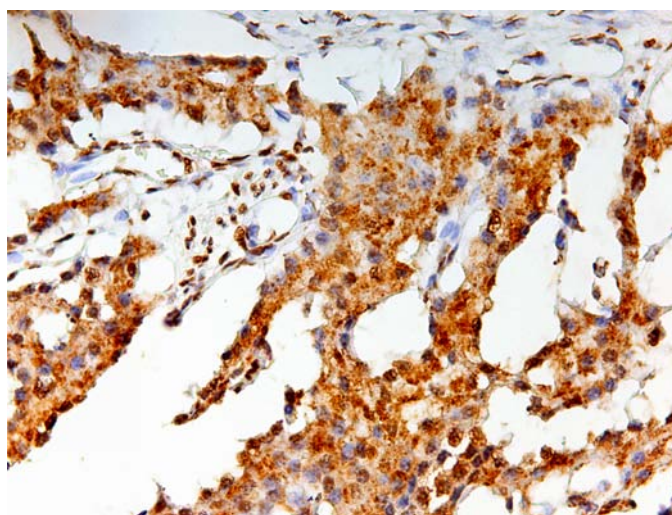


Рисунок 2 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p16INK4a. Золотисто-коричневое окрашивание более 80% ядерное и цитоплазматическое. Оценка – «положительная».

Оценка ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена **p53** рекомендуется производить по следующей системе:

- 0 – отрицательная – полное отсутствие окрашивания (рисунок 3);
- 1 – очаговая – слабая реактивность только в ядрах от 25 до 50% клеток, распределенная фокально или диффузно (рисунок 4);
- 2 – положительная – выявление окрашивания в ядрах более 50%, распределенного фокально или диффузно (рисунок 5).

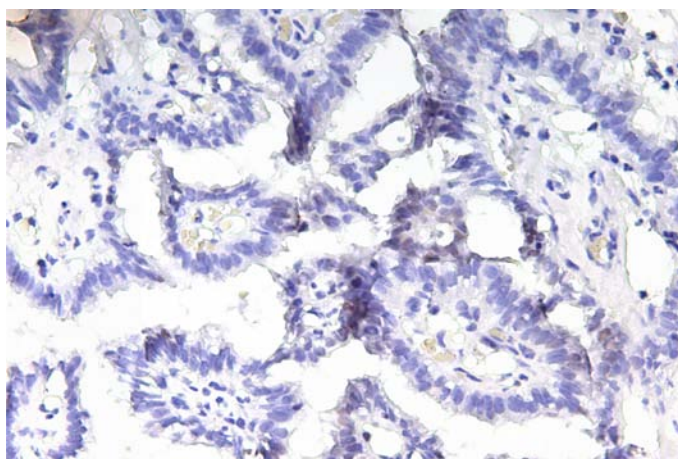


Рисунок 3 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание отсутствует. Оценка – «отрицательная».

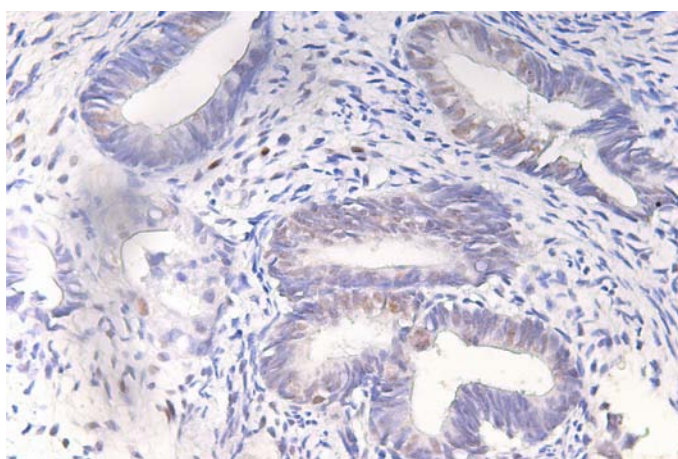


Рисунок 4 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание в 25% клеток желез. Оценка – «очаговая».

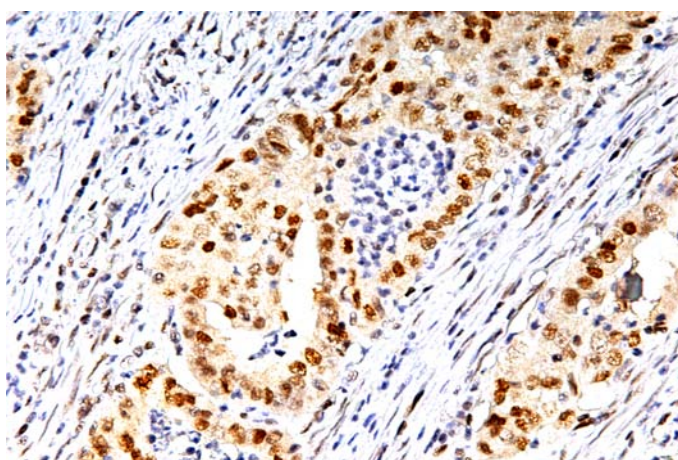


Рисунок 5 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание в 90% клеток железистого эпителия. Оценка – «положительная».

1. Выявление иммуногистохимическим методом экспрессии антигена p53 в железистых тканях шейки матки, у пациенток с аденогенными неоплазиями интерпретируется как злокачественный процесс: аденокарцинома, локализуемая в шейке.

Чувствительность данного теста составляет 72,1%, специфичность равна 78,6%, поэтому метод ИГХ исследования с использованием антигена к p53 может быть использован для дифференциальной диагностики аденокарцином в шейке матки с имитирующими их доброкачественными процессами.

2. Выявление иммуногистохимическим методом экспрессии антигена p16INK4a в железистых тканях шейки матки, у пациенток с аденогенными неоплазиями интерпретируется как потенциально злокачественный процесс: аденокарцинома шейки матки. При анализе полученных результатов исследования чувствительность теста с антигеном p16INK4a составляет 78,7%, специфичность высокая, равна 74,5%, поэтому метод ИГХ исследования с антигеном p16INK4a может использоваться для дифференциальной диагностики аденокарциномы происходящей из шейки матки.

3. При доброкачественных аденогенных гиперпластических процессах преобладает отрицательное окрашивание обоих маркеров.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнения отсутствуют.

Ошибки в осуществлении метода могут быть обусловлены:

– неправильным забором и транспортировкой биологического материала (замораживание материала в холодное время года с разрушением микроскопической структуры кристаллами льда, гниение материала в жаркую пору);

- неправильной фиксацией патоморфологического материала: некоторые эндогенные энзимы, такие как пероксидаза могут сохраняться в замороженной или недостаточно фиксированной формалином ткани;
- использованием старого архивного материала (характерно выраженное фоновое окрашивание);
- использованием реактивов с истекшим сроком годности или хранившихся с несоблюдением температурного режима;
- неправильным разведением реактивов;
- нарушениями в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо одно отрицательное и одно положительное контрольное окрашивание. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы не покрываются первичным антителом.