

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

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 (светоптические) 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 термостолике при температуре не более 45⁰ С. Можно помещать на ночь в термостат при температуре 37⁰ С.
4. Перед термической обработкой стекла инкубировать на термостолике 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).

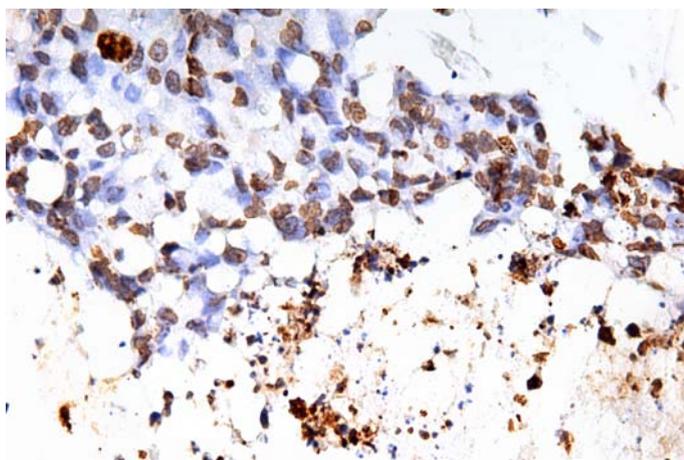


Рисунок 1 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p16INK4 – золотисто-коричневое окрашивание менее 80% ядер железистого эпителия, оцененное как «очаговая».

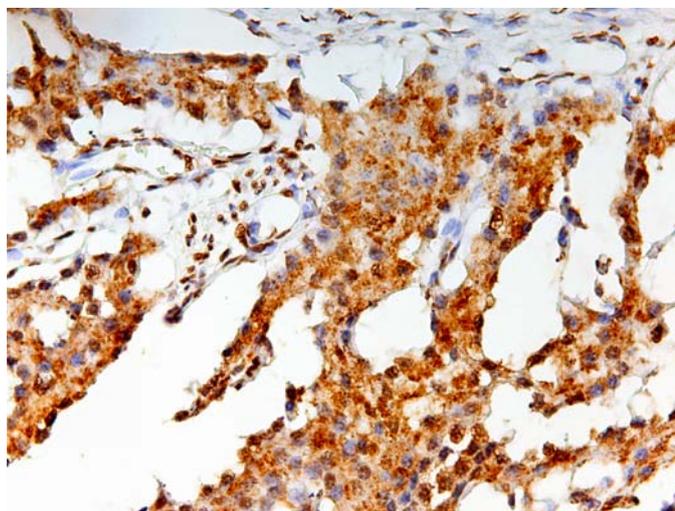


Рисунок 2 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p16INK4a. Золотисто-коричневое окрашивание более 80% ядерное и цитоплазматическое. Оценка – «положительная».

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).

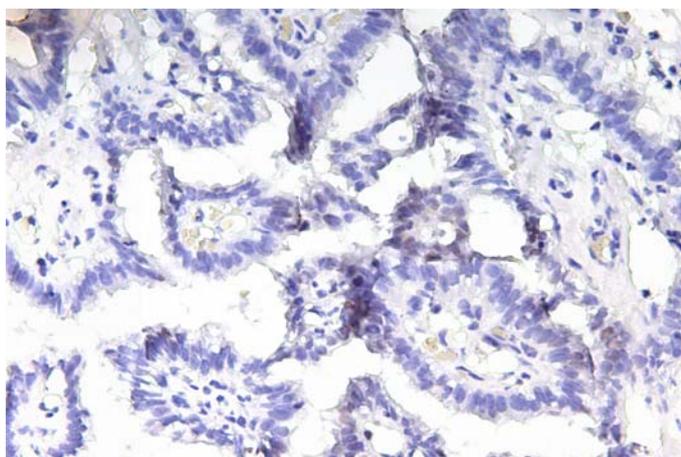


Рисунок 3 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание отсутствует. Оценка – «отрицательная».

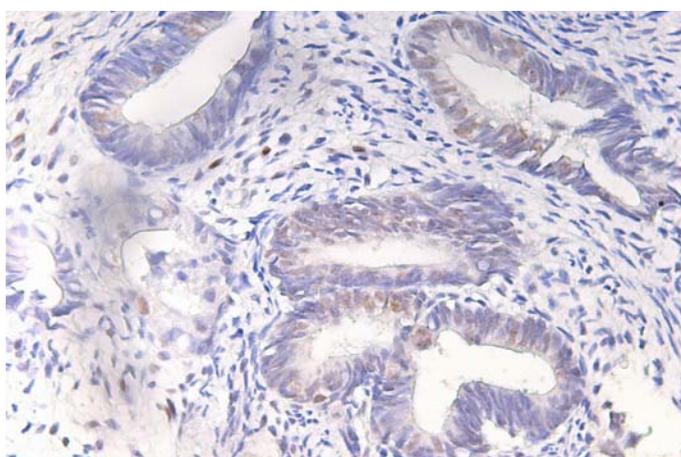


Рисунок 4 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание в 25% клеток желез. Оценка – «очаговая».

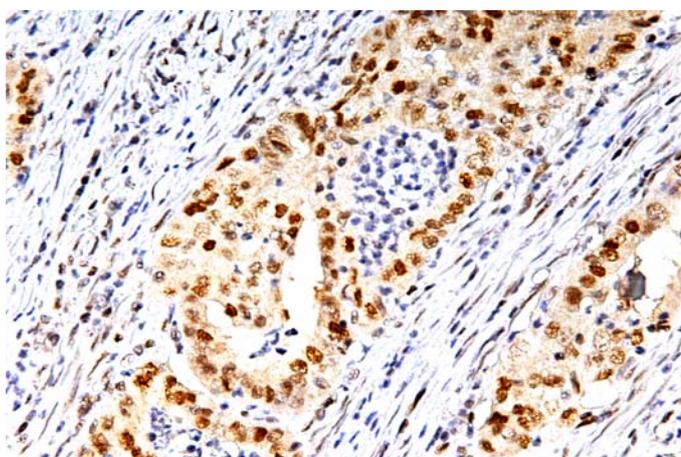


Рисунок 5 – результаты проведения ИГХ-реакции выявления экспрессии антигена p53. Золотисто-коричневое окрашивание в 90% клеток железистого эпителия. Оценка – «положительная».

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.