

МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневич

_____ 2019 г.

Регистрационный №

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У
ДЕТЕЙ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

Авторы: Т.М. Михалевская, Е.В. Волочник, д.м.н. Конопля Н.Е., д.м.н.,
член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод определения вероятности прогрессирования медуллобластом, пилоцитарных астроцитом и диффузных астроцитом, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по лечению опухолей головного мозга у детей.

Метод предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающих опухолями головного мозга.

Показания к применению: наличие у пациентов младше 18 лет медуллобластомы, пилоцитарной астроцитомы, диффузной астроцитомы II-IV степени злокачественности.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

1. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.

1. Микротом.
2. Сухожаровой шкаф.
3. Автоматический иммуногистохимический стейнер.
4. Прямой светооптический микроскоп.
5. Вытяжной шкаф.
6. Водяные бани-термостаты (2 шт.).
7. Микроцентрифуга-вортекс.
8. Гибридизатор (с возможностью охлаждения рабочей поверхности от 85°С до 37°С в течении 1 минуты).
9. Автоматические дозаторы переменного объема.
10. Холодильник (2-8°С).

11. Морозильник (-20°C).
12. Микроскоп флуоресцентный (общее увеличение x1000; объектив x100 подпружиненный, для масляной иммерсии).

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

1. Стекла с адгезивным электростатическим покрытием.
2. Реагенты для депарафинизации.
3. Буфер для демаскировки с высоким рН.
4. Универсальная визуализирующая система.
5. Контр-краситель.
6. Ксилол.
7. Монтирующая среда.
8. Первичные антитела к pEKK1/2, БЛАГ V600E, H3K271гуге%Бес1, ЛТКХ, p53, ПЖ1Ю32Н, Beta-calcp1п, ОЛБ1, корк.
9. Метанол.
10. Ледяная уксусная кислота.
11. ДНК-зонды для проведения флуоресцентной т вйи гибридизации специфичные к хромосомным регионам 2p24/ген *МУСЫ*, 8д24/ген *МУСС*, сепб и бд23, 17p13/17д21-22, 9p21-22/ген *СБКШЛ* (p16).
12. Буфер для проведения флуоресцентной т втл гибридизации.
13. Раствор 20x88С.
14. Детергент № 40.
15. Рабочий раствор красителя БАР1 (125 п§/тБ).
16. Спирт этиловый 70°, 80°, 96°.
17. 0,25% раствор трипсина.
18. Пепсин.
19. Раствор 1хБРБ8.
20. Микропробирки объемом 1,5 мл и 0,5 мл.

21. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл.

22. Предметные стекла.

23. Покровные стекла разных размеров: 18x18, 22x22, 24x24.

2. Технология использования предлагаемого метода

2.1 Проведение гистологического светооптического исследования.

Выполняют гистологическое исследование по стандартной технологии. Проводят светооптическое исследование микропрепарата биопсийного материала опухоли с определением нозологии (медуллобластома, пилоцитарная астроцитома, диффузные астроцитомы П-[^]степени злокачественности, смешанные нейроглиальные опухоли). Также оценивают информативность материала и выбирают наиболее репрезентативные участки ткани для проведения иммуногистохимического и цитогенетического исследования. В зависимости от нозологии выбирают диагностическую панель:

для медуллобластом определяют экспрессию иммунофенотипом Beta-catепт, ОЛБ1, ЖХРК, p53 и цитогенетически статус генов K1-МУС, С-МУС, топоб(c1e1бд) и И7;

для пилоцитарных астроцитом определяют экспрессию pEкK1/2, БкЛр V600E, и статус гена СБКШЛ;

для диффузных астроцитом П - [^] степени злокачественности - pEKK1/2, БКЛР V600E, Н3К27те, ЛТКХ, p53, ГОН1К132Н и статус гена СБКШЛ.

2.2 Проведение иммуногистохимического исследования

Для проведения иммуногистохимического исследования на микротоме нарезают срезы толщиной 3 мкм из выбранных готовых парафиновых блоков. Срезы ткани опухоли помещают на стекла с адгезивным электростатическим покрытием и высушивают в сухожаровом шкафу при температуре 100С в

течение 60 минут. Депарафинизацию проводят в автоматическом иммуногистохимическом стейнере с использованием коммерческого депарафинизирующего раствора с последующей тепловой демаскировкой эпитопа в коммерческом буфере с высоким рН при температуре 37 °С в течении 30 минут.

После экспозиции соответствующими первичными антителами в течении 32 мин при температуре 37 °С на препараты наносят коммерческую визуализирующую систему, содержащую универсальную визуализирующую систему на основе полимера; ЭЛБ-хромоген; ЭЛБ-субстрат; лувВ буфер; пероксидазный блок. Затем предметные стекла докрашивают контр-красителем в течение 8 минут, промывают в теплой мыльной воде, обезвоживают с помощью спиртов с восходящей концентрацией, ксилоле, покрывают с использованием монтирующего реагента.

Оценку результатов проводят с использованием светового микроскопа. Позитивным считают окрашивание на р53 при ядерном окрашивании более 10% опухолевых клеток при подсчете не менее 1000 клеток, на Beta-calеnп - при наличии цитоплазматического и ядерного окрашивания в на ЛТКХ, Н3К27те - при наличии ядерного окрашивания более 10% опухолевых клеток, на оЛБ1- при наличии диффузного цитоплазматического окрашивания, на корк - при наличии мембранного окрашивания, на БкЛр V600E и ГОН1 К132Н - при наличии цитоплазматического окрашивания и гиперэкспрессия рЕКК1/2 учитывалась при наличии ядерного и цитоплазматического окрашивания в более чем в 25% опухолевых клеток. Оценку экспрессии БКЛР V600E проводят в комплексе с оценкой рЕКК1/2 для исключения ложно-позитивной экспрессии БКЛР V600E.

2.3 Проведение цитогенетического исследования

Препараты переносятся в предварительно прогретый раствор 2x88С (37°С, 30 минут для мазков отпечатков; 80°С, 10 минут для РРРЕ). Охлаждаются в дистиллированной воде 3 минуты и подсушиваются пару минут при комнатной температуре. Далее переносятся в заранее прогретый

до 37°C рабочий раствор трипсина (на 45-55 минут для РРРЕ) или пепсина (на 3 минуты при мазках-отпечатках). После ферментной обработки срез промывается в дистиллированной воде, подсушивается при комнатной температуре и дегидратируется при помощи серии спиртов (70°, 80°, 96°) по 2 минуты в каждом растворе. Время и температура денатурации и гибридизации осуществляется согласно рекомендациям фирмы производителя при помощи гибридизатора.

После окончания гибридизации с препаратов снимаются покровные стекла и проводится отмывка в растворах 0,4x88С с добавлением 0,3% № 40 и 2x88С с добавлением 0,1% №Р40 (температура и время согласно рекомендациям фирмы-производителя зонда). После проводится дегидратация стекол в серии спиртов и их дальнейшая сушка при комнатной температуре в темноте (20-30 минут). После высыхания, в зону интереса наносится рабочий раствор БЛР1.

Анализ начинается через 10-15 минут после нанесения раствора ЭЛР1. Исследование производится под соответствующими флуорохромам фильтрами. При невозможности проведения анализа в день окраски, стекла возможно поместить в холодильник (2-8 °С) на несколько дней или в морозильник (-20 °С) на 1 -2 недели, без потери качества изображения. Анализ и регистрация данных производился в соответствии с рекомендациями 18СШ013. При подсчете диффузно располагающихся клеток с аберрантным расположением сигнала среди клеток с нормальным статусом учитывается процент анализируемого клона: для мазков-отпечатков положительным результатом считался более 15% клеток, для РРРЕ - более 30-35%.

3. Определение вероятности прогрессирувания нейроэпителиальных опухолей головного мозга у детей.

Метод определения вероятности прогрессирувания нейроэпителиальных опухолей головного мозга у детей представлен в виде таблицы.

4. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения

4.1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

4.2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

4.3. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т.д.).

Устранение: точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

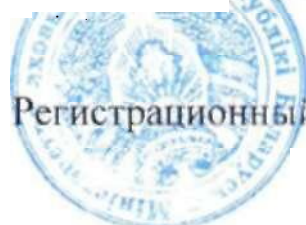
МИНСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ /с/ Д.Л. Пиневиц

МЦШЖ^ 2019 г.



Регистрационный № 0?*- 06Г9

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ
НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У
ДЕТЕЙ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

Авторы: Т.М. Михалевская, Е.В. Волочник, д.м.н. Конопля Н.Е., д.м.н.,
член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск, 2019