

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Т.И. Пиневиц

22 _____ 2015 г.

Регистрационный № 133-1115

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ
СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ**

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

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

Авторы:

д.б.н., доцент Смолякова Р.М., Гуляева Ю.В., Готько О.В., к.м.н. Киселев П.Г., к.м.н. Тризна Н.М.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
27.11.2016
Регистрационный № 133-1115

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: д-р биол. наук, доц. Р.М. Смолякова, Ю.В. Гуляева, О.В. Готько,
канд. мед. наук П.Г. Киселев, канд. мед. наук Н.М. Тризна

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм дифференциальной лабораторной диагностики опухолей слюнных желез путем оценки морфологических, иммуногистохимических (ИГХ) и молекулярно-биологических характеристик новообразований, который может быть использован в комплексе медицинских услуг по диагностике и лечению опухолей слюнных желез.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим опухолями слюнных желез.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов, толщиной не более 4 мкм.
2. pH-метр.
3. Термостат.
4. Холодильник бытовой.
5. Автоматические пипетки переменного объема.
6. Баня водяная с датчиком температуры или микроволновая печь.
7. Световой микроскоп.
8. Таймер.
9. Вортекс.
10. Амплификатор.
11. УФ-трансиллюминатор.
12. УФ-бокс.
13. Камера электрофоретическая.
14. Лабораторная посуда (стеклянные емкости для фиксации материала, контейнеры для предметных стекол, кассеты и емкости для изготовления парафиновых блоков, микропробирки типа «эппендорф» разного объема, автоматические дозаторы и наконечники к ним объемом 1–10, 20–200 мкл, 100–1000 мкл).
15. Покровные и силанизированные предметные стекла.
16. Реагенты для гистологической проводки тканей, изготовления парафиновых блоков, приготовления микропрепаратов, окрашенных гематоксилином-эозином, иммуногистохимического исследования (формалин, этанол, ксилол, парафин, воск, гематоксилин, эозин, глицерин, соляная кислота, аммиак, перекись водорода 3%, Tris-HCl отмывочный буфер, pH = 7,5, цитратный буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0, буфер для демаскировки антигенов, pH = 6,0, буфер для демаскировки антигенов, pH 9,0, первичные антитела к EGFR, Her-2/neu, p53, Ki-67, E-cadherin (для использования на формалин-фиксированных тканях), система визуализации, диаминобензидин (ДАБ), монтирующая среда для покровных стекол, карандаш для ИГХ, гематоксилин Майера).
17. Реагенты для молекулярно-биологических исследований (набор для выделения РНК, набор реагентов для реакции обратной транскрипции,

нуклеотидные праймеры контроля ПЦР-реакции, диагностические праймеры, рекомбинантная Taq-полимераза, ПЦР-буфер, смесь dNTP, деионизированная вода, 2%-й агарозный гель, минеральное масло).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Опухоли слюнных желез.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Требования, предъявляемые к материалу для исследования

Для морфологического, иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследования необходимо использовать фиксированные в 10%-м нейтральном формалине и залитые в парафин кусочки опухолевой ткани слюнной железы, полученные при стандартной патологоанатомической обработке материала.

2. Определение экспрессии маркеров биологической активности в опухолях слюнных желез

Экспрессия маркеров биологической активности Her-2/neu, EGFR, p53, E-cadherin и Ki-67 в ткани опухолей слюнных желез определяется в соответствии с инструкцией по применению «Метод определения экспрессии маркеров биологической активности опухолей слюнных желез» от 27.11.2014, № 120-1114.

3. Определение молекулярно-биологическим методом транслокаций t(6;9), t(11;19) в опухолях слюнных желез

Определение в ткани опухолей слюнных желез транслокации t(6;9) с образованием химерного гена MYB-NFIB методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией выполняется в соответствии с инструкцией по применению «Молекулярно-генетическая диагностика аденокистозного рака слюнных желез методом полимеразной цепной реакции» от 20.11.2013, № 126-1013.

Определение в ткани опухолей слюнных желез транслокации t(11;19) с образованием химерного гена MECT1-MAML2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией выполняется аналогичным образом с использованием специфических праймеров:

Химерный ген

MECT1-(F) 5' GCCTTCGAGGAGGTCATGA 3'

MAML2-(R) 5'CTTGCTGTTGGCAGGAGA3'

Контрольный ген GAPDH

GAPDH(F) 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3'

GAPDH(R) 5'GAAGATGGTGATGGGATTTTC3'

4. Диагностические морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические признаки доброкачественных опухолей слюнных желез

Стандартные морфологические признаки: четкая граница опухоли с прилежащими тканями, органоидность строения, наличие капсулы, низкая митотическая активность. Отсутствие клеточной атипии, патологических митозов, некрозов, периневральной и лимфососудистой инвазии.

Иммуногистохимические признаки: Ki-67<5%, негативная реакция с антителами к p53, EGFR, Her-2/neu, E-cadherin.

Молекулярно-биологические признаки: отсутствие транслокации t(6;9), t(11;19), нет амплификации гена Her-2/neu.

5. Диагностические морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-биологические признаки злокачественных опухолей слюнных желез

Стандартные морфологические признаки: солидный узел с нечеткой границей, без капсулы, признаки инвазии в прилежащие ткани, некрозы, высокая митотическая активность, периневральная и лимфососудистая инвазия, клеточный атипизм и полиморфизм, патологические митозы.

Иммуногистохимические признаки: Ki-67>5%, позитивная реакция с антителами к p53, EGFR, Her-2/neu, E-cadherin.

Молекулярно-биологические признаки: наличие транслокации t(6;9), t(11;19), амплификация гена Her-2/neu.

6. Диагностические признаки для определения степени злокачественности карцином слюнных желез

6.1. Аденокистозный рак слюнных желез

Градация степени злокачественности основывается на сочетании тубулярного, криброзного и солидного компонентов. G1 — высокодифференцированная опухоль, состоящая из тубулярных структур. G2 — умеренно дифференцированная опухоль, с преобладанием криброзного компонента, солидный занимает не более 30% объема. G3 — низкодифференцированный вариант, более 30% — солидный тип. Дополнительные диагностические признаки, характерные для случаев с дедифференцировкой опухоли в высокозлокачественную: >10 митозов/поле зрения на большом увеличении, обширные фокусы некроза, микропапиллы, выраженный ядерный атипизм, Ki-67>50%, p53>50%.

6.2. Мукоэпидермоидная карцинома

Градация степени злокачественности основана на балльной системе и учитывает следующие признаки: кистозный компонент <20% — 2 балла; периневральная инвазия — 2 балла; некроз — 3 балла; более 4 митозов/10 полей зрения при большом увеличении микроскопа — 3 балла; анаплазия — 4 балла. G1 — 0–4 балла, G2 — 5–6 баллов, G3 — 7–14 баллов.

Для прочих типов рака слюнных желез применяются общие диагностические принципы деления на степени злокачественности.

К карциномам с низкой степенью злокачественности относятся базальноклеточная аденокарцинома, ациноклеточная карцинома, светлоклеточная

аденокарцинома, полиморфная low-grade аденокарцинома, эпителиально-миоэпителиальная карцинома, цистаденокарцинома.

К карциномам с высокой степенью злокачественности относятся рак из протоков слюнных желез, плоскоклеточная карцинома, железисто-плоскоклеточный рак, онкоцитарная карцинома, недифференцированная крупно- и мелкоклеточная карцинома.

Дифференциальная лабораторная диагностика опухолей слюнных желез выполняется по алгоритму, приведенному на рисунке 1.

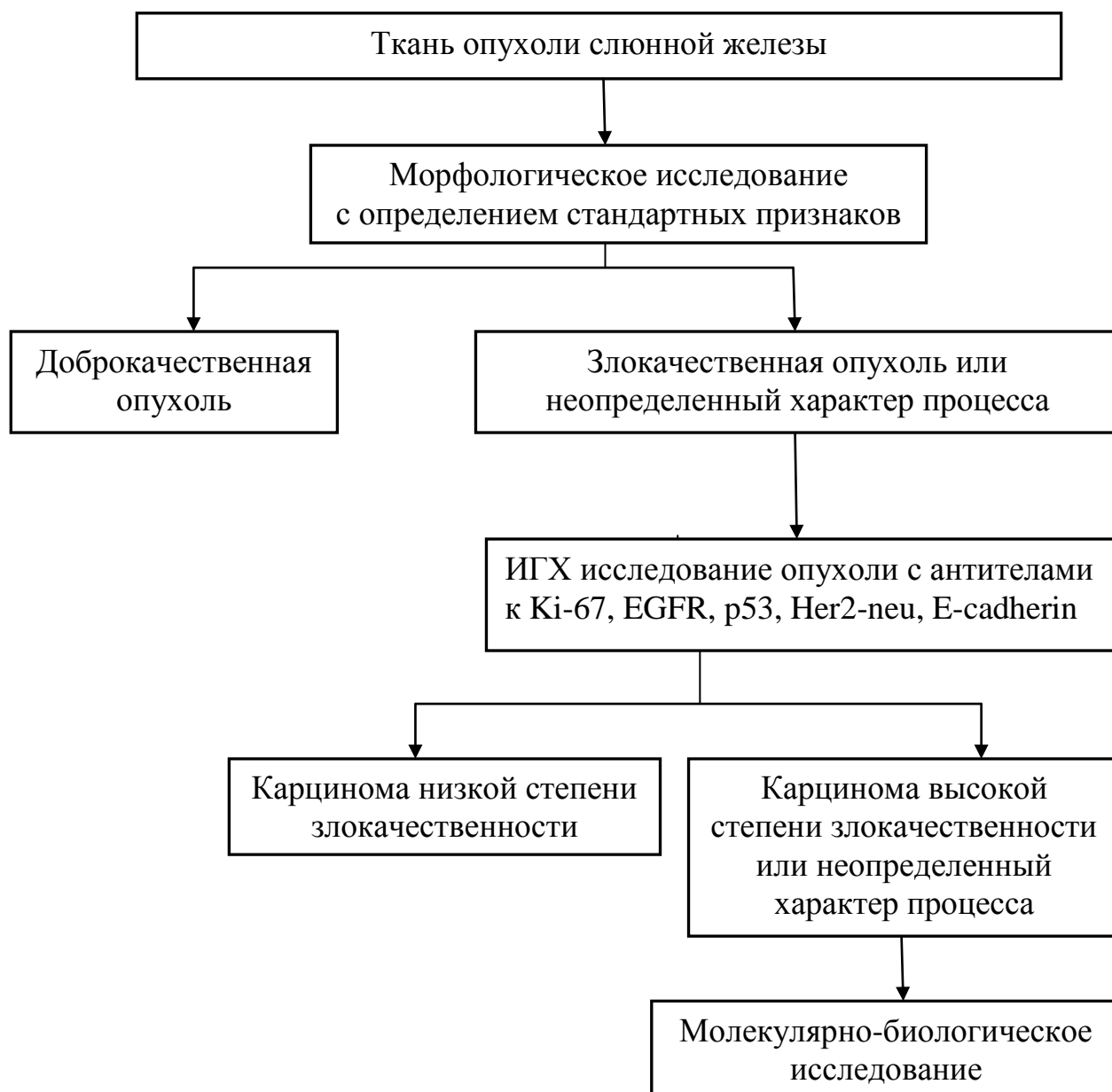


Рисунок — Алгоритм дифференциальной лабораторной диагностики опухолей слюнных желез

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибочные результаты при применении в диагностике иммуногистохимического и молекулярно-биологических методов могут быть получены при использовании реагентов с истекшим сроком годности, неточном их дозировании, неправильном заборе материала, нарушении фиксации и хранения тканевого материала (недостаточное или чрезмерное время фиксации, кислый, а не нейтральный формалин), нарушении технологии лабораторного тестирования (время инкубации, температурный режим и т. д.).