

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н. Кроткова

« 21 » 02 2023 г.

Регистрационный № 144-122d



**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАННИХ СТАДИЙ (IА-IIА) ГРИБОВИДНОГО МИКОЗА**
(инструкция по применению)

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Лукьянов А.М., канд. мед. наук, доц.
Бич Т.А., д-р мед. наук, доц. Портянко А.С., канд. мед. наук, доц.
Киселев П.Г., канд. мед. наук Субоч Е.И., канд. биол. наук Гутковская
Е.А., Медведь А.В.

Минский р-н, 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Е. Н. Кроткова

21.02.2023

Регистрационный № 144-1222

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАННИХ СТАДИЙ (IA-IIA) ГРИБОВИДНОГО МИКОЗА**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А. М. Лукьянов, канд. мед. наук, доц. Т. А. Бич, д-р
мед. наук, доц. А. С. Портянко, канд. мед. наук, доц. П. Г. Киселев, канд. мед. наук
Е. И. Субоч, канд. биол. наук Е. А. Гутковская, А. В. Медведь

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики ранних стадий грибовидного микоза (далее — ГМ) с использованием клинических/дермоскопических, патогистологических и молекулярно-биологических критериев.

Инструкция предназначена для врачей – онкологов-хирургов, врачей-дерматологов, врачей-патологоанатомов, врачей лабораторной диагностики и других врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями кожи в амбулаторных и/или стационарных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Перечень необходимого оборудования:

Хэндископ с двумя режимами работы (поляризация, неполяризация), с увеличением не менее чем 10х и возможностью фотофиксации на цифровой носитель.

Перечень медицинских изделий, реагентов, расходных материалов:

Изделия медицинского назначения для проведения патогистологического исследования:

- формалин 10 %-й нейтральный забуференный;
- лезвия для микротомов одноразовые;
- предметные стекла с адгезивным электростатическим покрытием;
- покровные стекла;
- наконечники полимерные одноразовые с фильтрами к дозаторам пипеточным для одноканального дозатора в диапазоне от 1 до 1000 мкл со штативом;
- 3 %-й раствор перекиси водорода или блокатор пероксидазы;
- гематоксилин Майера;
- среда для монтирования покровного стекла;
- деионизированная вода;
- ксилол;
- этиловый спирт 96°;
- маркер гидрофобный для ограничения зоны нанесения реагентов;
- марлевые салфетки;
- фильтровальная бумага;
- одноразовые латексные перчатки;
- буферные растворы для демаскировки антигенов;
- промывочный буфер;
- безсывороточная система растворов для устранения неспецифического фонового окрашивания (протеиновый блок);
- первичные антитела;
- дилуент для разведения первичных антител;
- универсальная система детекции (визуализации) к мышинным и кроличьим антителам;
- диаминобензидин;

- полимерные пробирки с защелкивающейся крышкой (1,0-1,5 мл).

Изделия медицинской техники для проведения патогистологического исследования:

- тканевой процессор;
- заливочный центр;
- микротом гистологический;
- водяная баня;
- термостат ($t = 35-70^{\circ}\text{C}$);
- холодильник бытовой;
- вытяжной шкаф;
- таймер электронный;
- емкости Коплина стеклянные;
- устройство для демаскировки;
- планшет для иммуногистохимического окрашивания;
- микроскоп световой.

Изделия медицинского назначения для проведения молекулярно-генетических исследований:

- набор реагентов для выделения ДНК из парафинизированной опухолевой ткани;
- набор реагентов для количественного определения двухцепочечной ДНК;
- набор реагентов для определения перестройки генов Т-клеточного рецептора методом флуоресцентного анализа на генетическом анализаторе;
- реагенты для молекулярно-генетического анализа (маркер длины ДНК 500 п.о., формамид, буферные растворы для генетического анализатора);
- одноразовые наконечники для автоматических дозаторов объемом от 0,5 до 1000 мкл;
- микропробирки для ПЦР.

Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетических исследований с использованием технологии фрагментного анализа:

- амплификатор;
- генетический анализатор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Пациенты с характерной кожной сыпью в виде пятен, тонких бляшек, имеющих:

- персистирующий характер кожных высыпаний;
- склонность к возникновению новых элементов;
- редуцированный эффект от предшествующей терапии топическими противовоспалительными лекарственными средствами (топические кортикостероиды – ТКС; топические ингибиторы кальциневрина – ТИК).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в три этапа.

Этап I – Клиническая оценка кожных патологических очагов с выбором сайтов для последующей биопсии

Медицинский осмотр пациентов — основополагающий критерий диагностики ранних стадий ГМ. Цель этапа — балльная оценка клинической симптоматики заболевания с последующим выбором оптимальных мест для биопсии.

Особенности кожных сыпей при ранних стадиях ГМ:

- первичный морфологический элемент — пятно, тонкая (реже инфильтрированная) бляшка;
- вариабельность размеров, цвета, формы отдельных элементов кожной сыпи;
- большинство патологических очагов крупные — более 5 см в диаметре, реже встречаются «длинные» или «пальцевидные» образования;
- нелеченные очаги медленно распространяются, могут подвергаться спонтанному просветлению, иногда сливаются друг с другом, что ведет к образованию крупных очагов неправильной формы;
- пойкилодермия (локальное сочетание поверхностной атрофии, пигментации, телеангиоэктазий и легкой инфильтрации) — важный, относительно специфичный для ГМ признак; стойкие пойкилодермические пятна в местах не подверженных солнечной инсоляции (зона «купальника») следует всегда рассматривать как ГМ, пока не будет доказано обратное при помощи биопсии.

Количество высыпаний при ранних стадиях ГМ:

- у большинства пациентов присутствуют множественные поражения и несколько очагов;

- встречаются варианты ГМ с единичными очагами (одноочаговый вариант).

Локализация сыпи:

- чаще сыпь появляется в зонах «купальника», там, где кожа не подвергается воздействию солнечного излучения (боковые поверхности груди, живота), а также на внутренних поверхностях рук, бедер, в периаксиллярных областях;

- при вовлечении в процесс фолликулярного аппарата кожи — могут поражаться кожа лица и волосистой части головы;

- неоплазия может проявляться как рефрактерный дерматоз ладоней или подошв.

Таблица 1 содержит балльную оценку клинических критериев ранних стадий грибовидного микоза.

Таблица 1 — Оценка клинических проявлений грибовидного микоза

Критерий	Оценка критерия в баллах
Основной Постоянное присутствие и/или возникновение новых «типичных» кожных проявлений (пятна, «тонкие бляшки»)	2 балла основной критерий + два дополнительных
Дополнительные - локализация сыпи по типу «купальника» - вариативность площади/размеров очагов - пойкилодермия	1 балл основной критерий + один дополнительный

После клинической оценки патологических изменений на коже, проводят процедуру получения кожных биоптатов, для последующих исследований.

Правильному выбору морфологического элемента для биопсии способствует проведение дермоскопического исследования, которое выявляет наличие следующих паттернов:

- точечный сосудистый (может быть представлен точечными сосудами с равномерным/регулярным или неравномерным/нерегулярным расположением);
- линейный сосудистый (представлен короткими линейными сосудами);
- ветвящийся сосудистый (представлен ветвящимися сосудами);
- смешанный (представлены сразу несколько типов сосудов);
- бесструктурный (желто-коричневые пятна).

Основные правила проведения биопсии при подозрении на грибовидный микоз изложены в таблице 2.

Таблица 2 — Правила проведения биопсии при подозрении на грибовидный микоз

Правило	Комментарий
Отмена топических лекарственных средств с противовоспалительным эффектом (ТКС ¹ , ТИК ²) за 2-4 недели до выполнения биопсии	При несоблюдении правила – высокие риски получения ложноотрицательных результатов на 2 и 3 этапах
Отмена системных иммуносупрессантов и кортикостероидов за 2-4 недели до выполнения биопсии	При несоблюдении правила – высокие риски получения ложноотрицательных результатов на 2 и 3 этапах
Предпочтительна инцизионная биопсия (не менее 20-30 мм в длиннике)	Панч-биопсия, шейв-биопсия не могут быть использованы из-за недостаточного количества материала для успешного проведения 2 и 3 этапов
Биопсия должна выполняться одномоментно из нескольких мест (не менее 2-3)	Предпочтительно выполнять иссечение биоптата из очагов, находящихся в разной фазе развития (первичные и «свежие» высыпания)
Рекомендуемый интервал для повторного морфологического исследования – 6-12 мес.	Получение отрицательного результата диагностики грибовидного микоза при сохранении клинических проявлений дает право исследователю на проведение повторных биопсий (количество процедур не ограничено)
Примечания 1 ТКС – топические кортикостероиды. 2 ТИК – топические ингибиторы кальциневрина.	

Этап II — Оценка патогистологических критериев в биоптатах кожи

Патогистологическое исследование, включает оценку биоптатов кожи при рутинной окраске гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимическое исследование (далее — ИГХИ). Цель этапа — балльная оценка ключевых патогистологических признаков заболевания и результатов ИГХИ, имеющих наибольшую диагностическую значимость.

К основному гистологическому критерию относится:

- поверхностный лимфоцитарный инфильтрат — скопление лимфоцитов в папиллярной дерме, как правило в виде полосовидного паттерна.

Дополнительные критерии включают:

- эпидермотропизм без спонгиоза — появление в эпидермисе лимфоцитов (не обязательно атипичных), распределенных поодиночке или небольшими скоплениями без фонового межклеточного отека, характерного для воспалительных дерматозов (так называемый диспропорциональный эпидермотропизм);

- атипичные лимфоциты — лимфоциты как правило малого и среднего размера, с сильно извитыми (церибрифорными) контурами ядер, часто с просветленной цитоплазмой, колонизирующие преимущественно базальный слой эпидермиса.

Для иммунофенотипирования лимфоцитарного инфильтрата при ГМ используются следующие маркеры к Т-лимфоцитам — CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Оценка результатов ИГХИ осуществляется полуколичественно с определением процента клеток, экспрессирующих каждый из маркеров (таблица 3). При подсчете баллов следует руководствоваться следующими принципами:

- более 50 % Т-лимфоцитов экспрессируют CD2, CD3, CD4, CD5 и менее чем 10 % Т-лимфоцитов экспрессируют CD7 и/или CD8;

- выявляется эпидермально-дермальная дискордантность экспрессии CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 и/или CD8 — уменьшение и/или потеря экспрессии данных маркеров происходит в первую очередь в эпидермисе.

Уменьшение или потеря экспрессии CD7 и/или CD8, в сравнении с другими Т-клеточными маркерами, более специфичны для ГМ.

Правила оценки патогистологических критериев приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Оценка патогистологических критериев грибовидного микоза

Критерий	Оценка критерия в баллах
Гистологические	
Основной Поверхностный лимфоцитарный инфильтрат	2 балла основной критерий + два дополнительных
Дополнительные - эпидермотропизм без спонгиоза - атипичные лимфоциты ¹	1 балл основной критерий + один дополнительный

Продолжение таблицы 3

Иммуногистохимические	
- >50 % лимфоцитов CD2+, CD3+, CD4+, CD5+ и <10% Т-клеток CD7+ и/или CD8+ - эпидермальная/дермальная дискордантность экспрессии CD2, CD3, CD4, CD5 и CD7/CD8 ²	1 балл за один и более критериев
Примечания 1 Лимфоидные клетки малого и среднего размеров с резко извитыми (церибриформными) контурами ядер. 2 Выпадение экспрессии Т-клеточных антигенов ограничена эпидермисом.	

Этап III — Оценка молекулярно-биологических критериев в биоптатах кожи

Для проведения процедуры молекулярного тестирования используются наборы реагентов для выделения ДНК из парафинизированной опухолевой ткани, количественной оценки двухцепочечной ДНК, определения перестройки генов Т-клеточного рецептора методом флуоресцентного анализа на генетическом анализаторе, согласно инструкциям производителей.

Интерпретация результатов

Присутствие одного или двух положительных ПЦР-продуктов в пределах допустимого диапазона размеров расценивается как наличие реаранжировки генов γ - или β -цепей Т-клеточного рецептора, характерной для клональной клеточной популяции.

Критериями определения ПЦР-продуктов, как положительных, являются:

- ПЦР-продукты тестируемых образцов, которые попадают в допустимый диапазон размеров и не менее чем в три раза превышают амплитуду третьего по величине продукта в поликлональном фоне;

- ПЦР-продукты повторно тестируемых образцов, которые попадают в допустимый диапазон размеров и не менее чем в три раза превышают амплитуду третьего по величине продукта, либо превышают амплитуду соседних ПЦР-продуктов и идентичны по размеру клональным продуктам, ранее полученным от того же пациента с использованием той же смеси для ПЦР, являются положительными;

- ПЦР-продукты тестируемых образцов, которые попадают в допустимый диапазон размеров и отличаются от всех фоновых продуктов.

Отсутствие положительных ПЦР-продуктов в пределах допустимого диапазона размеров расценивается как негативный результат по определению клональной реаранжировки генов γ или β -цепей Т-клеточного рецептора.

Ограничениями по использованию молекулярно-биологических критериев являются:

- отсутствие 100 % чувствительности при идентификации популяций клональных клеток;

- отсутствие возможности обнаружения менее 1 клетки с клональной перестройкой на 100 нормальных клеток;

- низкое качество и недостаточное количество исследуемой ДНК.

Таблица 4 содержит балльную оценку молекулярно-биологических критериев ранних стадий ГМ.

Таблица 4 — Оценка молекулярно-биологических критериев грибовидного микоза

Критерий	Оценка критерия в баллах
Наличие клональной перестройки гена TCR	1 балл
Примечание — TCR (T-cell receptor) — Т-клеточный рецептор.	

Критерии постановки диагноза грибовидного микоза

Для диагностики грибовидного микоза требуется набрать 4 балла и более на основании любой комбинации баллов из клинических, патогистологических и молекулярно-биологических критериев.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1.1 На этапе получения кожных биоптатов возможны следующие осложнения: кровотечение, лихорадка, потеря сознания во время проведения манипуляции, гематома. Гнойно-септические осложнения, после перенесенной биопсии кожи могут развиваться не более чем у 1–3 % пациентов. Лечение осложнений выполняется общепринятыми методами в соответствии с клиническими протоколами диагностики и лечения пациентов с острыми хирургическими заболеваниями (утв. постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 46). Профилактика и лечение аллергических состояний, связанных с введением местных анестетиков, проводится в соответствии с клиническими протоколами диагностики и лечения пациентов с аллергическими заболеваниями (утв. приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2005 № 274).

1.2 На этапе проведения патогистологического/ иммуногистохимического исследований возможны следующие ошибки.

Избыточная толщина гистологического среза биоптата кожи, препятствующей оценке цитологических и патогистологических признаков. Описание: при микрорегулировке резкости посредством микровинта микроскопа в поле зрения определяется несколько слоев клеток. Путь устранения: изготовить срезы меньшей толщины из парафинового блока — толщина среза ткани с парафинового блока не должна превышать 3 мкм.

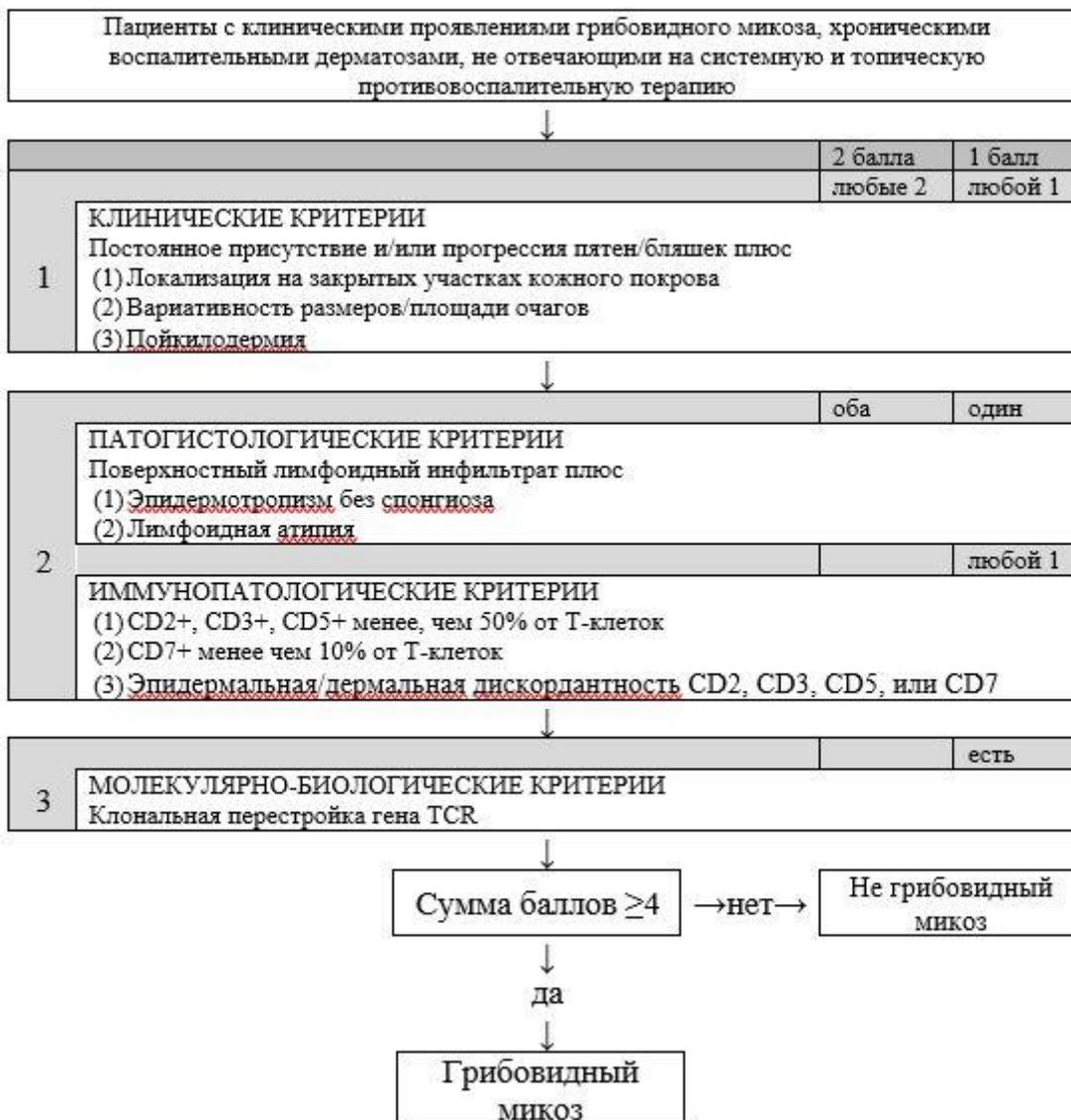
Низкое качество пробоподготовки ткани, заключенной в парафиновый блок. Описание: наличие выраженных артифициальных изменений ткани, делающих оценку морфологических деталей опухолевых клеток невозможной. Путь устранения: при невозможности морфологической интерпретации и иммунофенотипирования, повторить биопсию. Перед началом повторной пробоподготовки материала проверить (и при необходимости скорректировать) используемые в лаборатории условия и продолжительность фиксации, вырезки, проводки, заливки в парафин, нарезки и окраски материала кожного биоптата.

Неудовлетворительное качество иммуногистохимического окрашивания. Описание: отсутствие ожидаемой экспрессии маркера, неспецифичное окрашивание, окрашивание низкой интенсивности, затрудняющее интерпретацию, отсутствие окрашивания со всеми антителами диагностической панели и т. д. Путь устранения: повторить окрашивание исследуемого биоптата на одном стекле с положительным контролем. При необходимости провести корректировку условий демаскировки антигена, времени экспозиции первичного антитела, его разведения (если применимо), экспозиции компонентов системы детекции, температурного режима лаборатории.

1.3 На этапе проведения молекулярно-биологических исследований возможны ошибки, связанные с нарушениями в технологии лабораторного тестирования (несоблюдение времени инкубации, температурного режима и т. д.). Для их устранения рекомендуется не использовать реагенты с истекшим сроком годности, точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Алгоритм диагностики ранних стадий (IA-IIA) грибовидного микоза



УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения, в котором
внедрен метод

« _____ » _____ 202__ г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения: «Метод комплексной диагностики ранних стадий (IA-IIA) грибovidного микоза».
2. Кем предложено: ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Республика Беларусь, 223040, Минский р-н, аг. Лесной; д-р мед. наук, проф. А. М. Лукьянов, канд. мед. наук, доц. Т. А. Бич, д-р мед. наук, доц. А. С. Портянко, канд. мед. наук, доц. П. Г. Киселев, канд. мед. наук Е. И. Субоч.
3. Источник информации: инструкция по применению № от
4. Где и когда начато внедрение
5. Общее количество наблюдений
6. Результаты метода за период с _____ по _____
положительные (количество наблюдений)
отрицательные (количество наблюдений)
неопределенные (количество наблюдений)
7. Эффективность внедрения
8. Замечания, предложения

Дата

Ответственные за внедрение:

должность,

Ф.И.О.

подпись

Примечание: акт о внедрении направляется организации-разработчику (п. 2), п.п. 4-8 заполняются организацией, внедрившей разработку.