

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневич

_____ 2018 г.

Регистрационный № 073 – 0618



**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Учреждение здравоохранения «Минский городской клинический онкологический диспансер»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Гончаров А.Е., д-р. мед. наук, проф. Прохоров А.В., Бущик О.В., Романовская С.Э., Колошко Л.Р.

Минск, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования эффективности лечения злокачественных опухолей поджелудочной железы на основе определения содержания циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) периферической крови, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение злокачественных новообразования поджелудочной железы.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в амбулаторных и (или) стационарных условиях.

1 Показания к применению

Пациенты со злокачественным новообразованием поджелудочной железы (C25 по МКБ-10), получившие комплексное (радикальное хирургическое лечение и лекарственную терапию) лечение, химиолучевую терапию, паллиативное хирургическое и химиолучевое лечение.

2 Перечень необходимых изделий медицинского назначения, медицинской техники

2.1 Медицинская техника:

1. проточный цитофлуориметр (минимум 4 канала флуоресценции);
2. автоматические дозаторы;
3. центрифуга низкоскоростная;
4. шейкер орбитальный.

2.2 Изделия медицинского назначения:

1. наконечники пластиковые;
2. пробирки для цитофлуориметра;
3. вакутайнеры с ЭДТА;

4. пробирки полипропиленовые;
5. емкости для хранения и дезинфекции отработанного биологического материала;
6. моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами для определения циркулирующих опухолевых клеток с иммунофенотипом EpCAM (CD326)⁺CD45⁻;
7. интеркалирующий краситель (зонд) для идентификации мёртвых клеток;
8. лизирующий раствор на основе хлорида аммония;
9. фосфатный буферный раствор Дульбекко (DPBS), не содержащий ионов двухвалентных металлов.

2.3 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные или нитриловые перчатки;
3. дезинфицирующий раствор для инактивации биологического материала.

3 Технология использования метода

3.1 Забор материала

Забор крови в количестве 7,5 мл проводят утром натощак из локтевой вены в вакутайнер с ЭДТА. Закрытый вакутайнер с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

3.2. Правила транспортировки и хранения материала

Вакутайнеры с кровью доставляют в лабораторию непосредственно в день забора материала. Кровь хранят до использования не более 24 часов при температуре от +18 до +25°C.

3.3 Пробоподготовка

В пробирку объемом 50 мл вносят 7,5 мл образца крови. Добавляют 42,5 мл лизирующего раствора и тщательно перемешивают

содержимое пробирки. Инкубируют пробирку на протяжении 15 минут, затем осаждают клетки центрифугированием. Отбирают супертанант пипетированием, клетки суспендируют в 3 мл DPBS и переносят в пробирку объемом 5 мл. Осаждают клетки центрифугированием и добавляют к клеткам моноклональные антитела к молекулам CD326 и CD45, а также зонд для идентификации мертвых клеток, инкубируют в течение 15 минут при +2–8°C в темноте. Клетки отмывают от антител и зондов и ресуспендируют в 2000 мкл DPBS.

3.4 Учет данных

В процессе анализа ЦОК выполняют последовательное гейтирование одиночных клеток, жизнеспособных клеток, построение цитограммы в координатах CD45\CD326, выделение региона CD326^{hi}CD45⁻ событий (ЦОК). Рассчитывают процентное содержание ЦОК среди всех жизнеспособных ядродержащих клеток периферической крови и количество ЦОК на 1 мл крови.

3.5 Интерпретация данных

Прогностически неблагоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы является содержание ЦОК в периферической крови 1 кл/мл и более.

Прогностически благоприятным в отношении эффективности лечения злокачественных новообразований поджелудочной железы является отсутствие ЦОК в периферической крови или их содержание менее 1 кл/мл.

4 Противопоказания к применению

Отсутствуют.

5 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Чрезмерные потери клеток	Недостаточное время центрифугирования	Соблюдать время центрифугирования
	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Следовать пунктам инструкции
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Правильно готовить и хранить раствор
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на шейкере