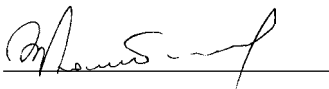


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

12 июня 2003 г.

Регистрационный № 44–0203

**ПРОВЕДЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ МЕЖДУ
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ
И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯИЧНИКОВ
(ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ,
ОПУХОЛИ СТРОМЫ ПОЛОВОГО ТЯЖА,
ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ КИСТЫ)
С ПРИМЕНЕНИЕМ РАДИОИММУННОГО
И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДОВ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ
В ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Витебский государственный медицинский университет, Гомельский государственный медицинский институт, Витебский областной онкологический диспансер

Авторы: С.В. Малашенко, д-р мед. наук, проф. Ю.В. Крылов, д-р мед. наук, проф. А.Н. Лызиков, канд. мед. наук А.В. Томчина

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Проведение дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников (эпителиальные опухоли, опухоли стромы полового тяжа, фолликулярные кисты) для последующего определения тактики ведения больных, необходимости оперативного лечения и уточнения объема оперативного вмешательства.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Для проведения иммунорадиометрического анализа (РИА) *in vitro* необходимы:

1. Наборы реактивов производства ГП ХОП ИБОХ НАНБ, г. Минск. «ИРМО-Ферритин», «РИО-РЭА-¹²⁵I-М», «РИА-Эстрадиол-ПА».

2. Полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 5 мл.

3. Стекланные или пластиковые (прозрачные) пробирки для проведения анализа вместимостью 3–5 мл.

4. Штатив для пробирок.

5. Устройство для встряхивания пробирок («шейкер»).

6. Магнитная мешалка.

7. Вихревой смеситель типа ВП.

8. Центрифуга с горизонтальным ротором, развивающая ускорение 1500–2000 g, значение g определяется по формуле:

$$g = 1,118 \times 10^{-5}(\text{об./мин})^2 \times R,$$

где R — радиус ротора центрифуги в см.

9. Водоструйный насос.

10. Гамма-счетчик, позволяющий измерять активность изотопа [¹²⁵I].

11. Дистиллированная вода.

Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) *in vitro* необходимы:

1. Набор реактивов CanAgCA125EIA (производства CanAg Diagnostics, Швеция или аналогичный).

2. Микропланшетный встряхиватель («шейкер»). Интенсивность встряхивания должна быть от средней до сильной величины. Линейное встряхивание 200 ударов/мин, колебания 700–900/мин.

3. Микропланшетный промыватель («вошер»). Любой автоматический вошер, способный производить 1, 3, 6 циклов отмывки, или полуавтоматический вошер, объединенный к вакуумному или стуйному насосу и дренажной трубке для возврата аспирированной жидкости.

4. Микропланшетный спектрофотометр («ридер»). Длина волны 620 и/или 405 нм, диапазон измерения оптической плотности от 0 до 3,0.

5. Микродозаторы диапазона 25, 50 и 100 мкл с пластиковыми наконечниками. Дополнительно (но не обязательно) можно использовать 8-канальный дозатор или диспенсер на 100 мкл с пластиковыми наконечниками.

6. Дистиллированная или деионизированная вода для разведения.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Программа дифференциального дооперационного ведения больных с новообразованиями яичников включает в себя 4 этапа (рис. 1). На первом этапе (аналитическом) на основании жалоб (если таковые есть), данных бимануального, ректовагинального исследований устанавливается факт наличия опухоли в малом тазу. На втором этапе на основании данных эхографии органов малого таза формируется топический диагноз. На третьем этапе при наличии на УЗИ подозрения на злокачественный процесс выполняется пункция через задний свод влагалища с цитологическим исследованием пунктата. Четвертый этап (в случаях, подозрительных на рак яичников) — определение опухолевых маркеров в перитонеальной жидкости (ПЖ) проводится при отрицательных результатах цитологического исследования пунктата и является дополнительным к цитологическому исследованию методом верификации рака яичников и опухолей стромы полового тяжа. С уточненным диагнозом больная направляется в соответствующий специализированный стационар. Больные с верифицированными на УЗИ опухолевидными образованиями, которые чаще всего являются функциональными

кистами яичников, но могут быть и сецернирующими цистаденомами, в течение 2–3 мес. подвергаются динамическому наблюдению. При этом фолликулярные кисты зачастую уменьшаются в размерах и исчезают. В случаях сохранения образования или увеличения его размеров необходим третий этап — цитологическое исследование пунктата брюшной полости для исключения возможной малигнизации и четвертый этап, который заключается в определении опухолевых маркеров в ПЖ. Определение опухолевых маркеров при опухолевидном образовании продиктовано необходимостью дифференциальной диагностики между фолликулярными кистами и доброкачественными цистаденомами яичников, т.к. последние в связи с возможностью их малигнизации нуждаются в оперативном удалении, фолликулярные же кисты до проведения их оперативного удаления можно попытаться лечить гормональными препаратами и путем пунктирования их содержимого.

1 этап — аналитический

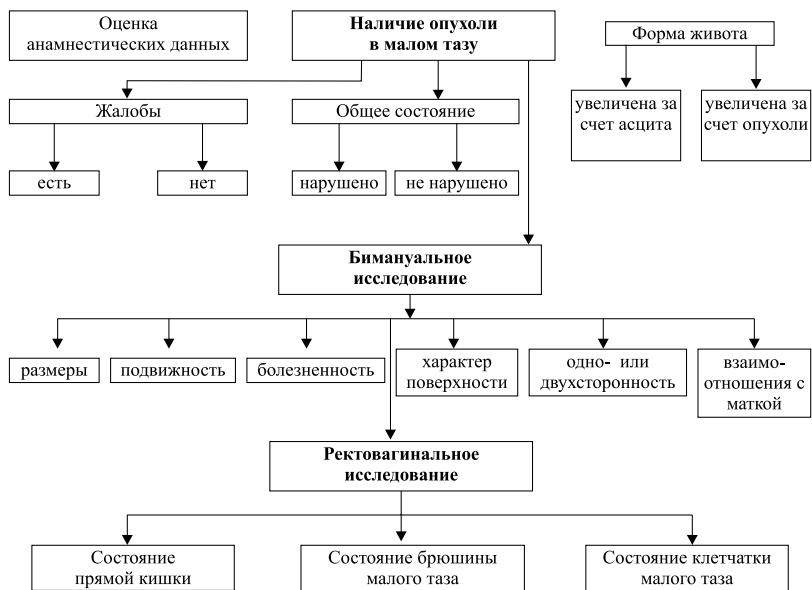
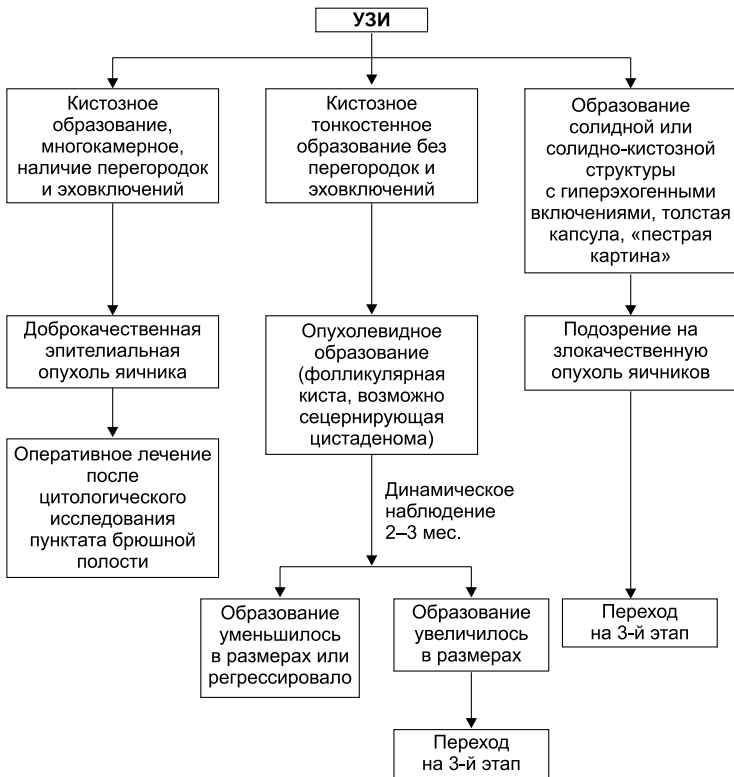
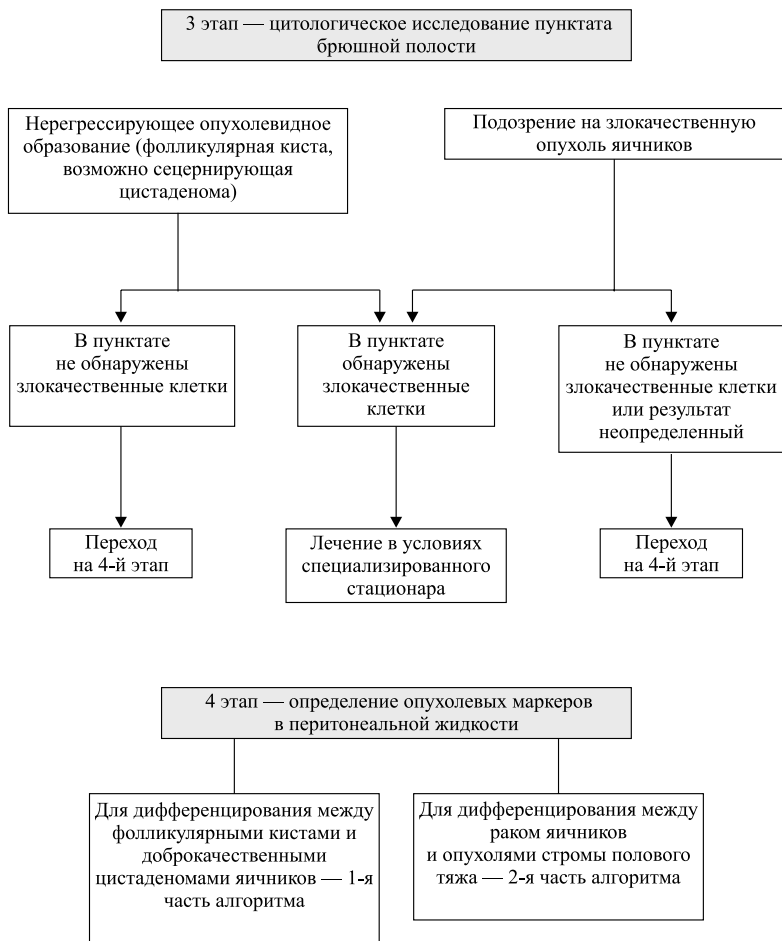


Рис. 1. Программа дифференциального дооперационного ведения больных с новообразованиями яичников

2 этап — формирование топического диагноза



Продолжение рис. 1. Программа дифференциального дооперационного ведения больных с новообразованиями яичников



Окончание рис. 1. Программа дифференциального дооперационного ведения больных с новообразованиями яичников

При определении опухолевых маркеров в ПЖ используется следующая панель: СА-125, раково-эмбриональный антиген (РЭА), ферритин и эстрадиол. Ниже представлены пороговые значения используемых опухолевых маркеров, диагностический алгоритм их определения в ПЖ (рис. 2) и рекомендации по проведению иммуноферментного и радиоиммунного анализов опухолевых маркеров в ПЖ.

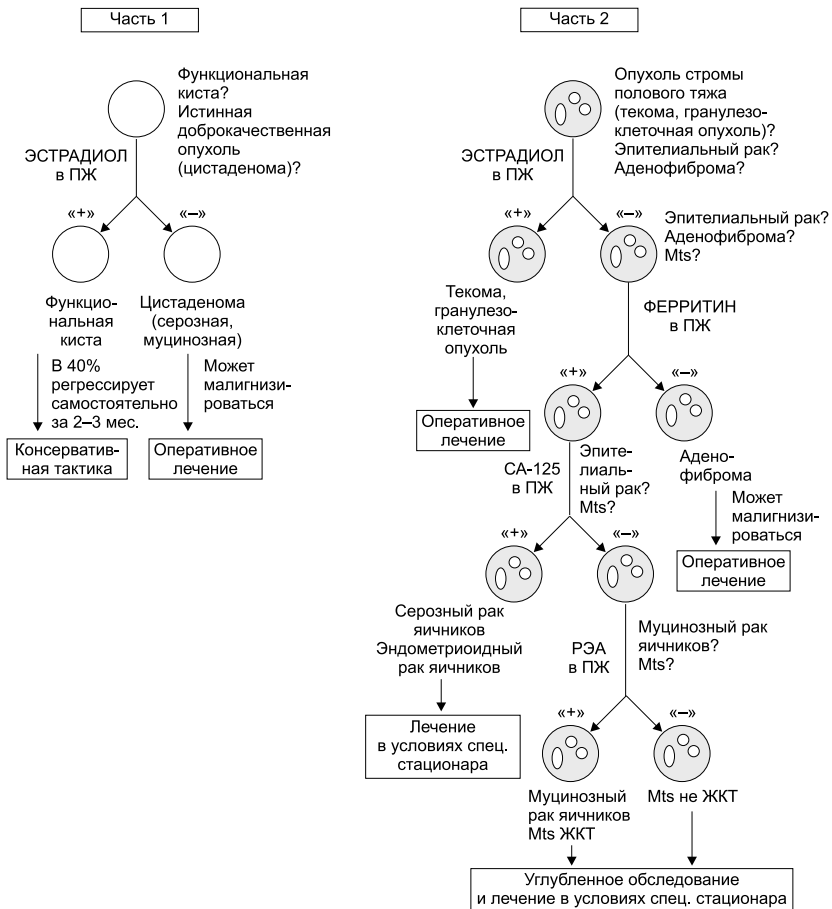


Рис. 2. Алгоритм определения опухолевых маркеров в ПЖ для дифференциальной диагностики между фолликулярными кистами яичников и доброкачественными цистаденомами (часть 1) и между раком яичников и опухолями стромы полового тяжа (часть 2).

Пороговые уровни опухолевых маркеров в перитонеальной жидкости

Пороговый уровень эстрадиола в ПЖ, позволяющий верифицировать опухоли стромы полового тяжа — 6 нмоль/л (чувствительность — 94%, специфичность — 89%).

Пороговый уровень ферритина в ПЖ, при котором обнаруживаются эпителиальные раки (в том числе ранних стадий) и метастазы в яичники, — 260 нг/мл (чувствительность — 87%, специфичность — 84%).

Пороговый уровень СА-125 в ПЖ для дифференциальной диагностики между серозными, эндометриоидными и другими раковыми опухолями яичников — 800 МЕ/мл (чувствительность — 82%, специфичность — 82%).

Уровень РЭА в ПЖ, позволяющий отличить муцинозные раки яичников, а так же метастазы опухолей желудочно-кишечного тракта от других метастатических поражений яичников (рак молочной железы), — 110 нг/мл (чувствительность — 88%, специфичность — 97%).

Пороговый уровень эстрадиола в ПЖ, позволяющий отличить фолликулярные кисты яичников от цистаденом, — 1,5 нмоль/л (чувствительность — 86%, специфичность — 82%). При применении этого алгоритма точность метода для дифференцирования между фолликулярными кистами и доброкачественными цистаденомами яичников составила 83%, для дифференцирования между раком яичников и опухолями стромы полового тяжа — 88%.

Сбор и хранение образцов

ПЖ получают путем аспирации при пункции дугласова пространства через задний свод влагалища или во время проведения лапароскопии на 6–7-й день менструального цикла, если он имеется. Для исследования берут слой надосадочной жидкости, полученной при 1000 об./мин. Образцы ПЖ могут храниться не более 2 дней при температуре +2...+8° С. Для более длительного хранения образцы надосадочной жидкости консервируют добавлением 5% азиды натрия (NaN₃) из расчета 0,02 мл на 1 мл надосадочной жидкости, разливают в отдельные закрывающиеся пробирки по 0,1 мл и хранят при температуре –20° С. Сильно гемолизированные, мут-

ные и образцы с высокой липемией могут дать ошибочные результаты. Необходимо избегать повторного замораживания и оттаивания образцов. Размораживать образцы необходимо постепенно (предпочтительнее оставить на ночь в холодильнике при температуре +2...+8° С). Перед исследованием образцы довести до комнатной температуры (+20...+25° С).

Примечания к проведению исследований

1. Для правильного использования наборов тщательно прочитайте прилагаемые инструкции. Реагенты представляют собой целостный набор для анализа. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов разных лотов. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (+20...+25° С). Для получения точных результатов исследование должно проводиться только при температуре +20...+28° С. Размораживание замороженных образцов должно производиться постепенно и сопровождаться осторожным перемешиванием вручную. Не допускается взбалтывание и грубое перемешивание образцов пациентов или калибраторов.

3. Перед пипетированием стандартов, контролей и образцов рекомендуется промаркировать стрипы микропланшета и пробирки для идентификации образцов в ходе исследования и после его окончания.

4. Необходимо очень тщательно проводить процедуру отмывки. При проведении ИФА убедитесь, что каждая лунка заполнена до краев, аспирация содержимого лунки полная и лунки остаются сухими между циклами и после отмывки. Если в лунках осталась жидкость, переверните планшет и аккуратно постучите им по фильтровальной бумаге. При работе с автоматическим промывателем следуйте инструкциям производителя по обслуживанию прибора. Производите отмывку стрипов в соответствии с рекомендациями, необходимое число раз до и после каждого этапа инкубации. Не оставляйте моющий узел прибора наполненным промывающим раствором на длительное время, т.к. это повлечет за собой засорение иголок и нарушение процесса подачи и аспирации жидкости.