

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«14» *августа* 2017 г.

Регистрационный № 017.0217

МЕТОД

ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ ПУТЕМ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

ERBB-2/HER2-NEU И SURVIVIN (BIRC5)

В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ СОЛИДНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Шляхтунов Е.А., д.м.н., профессор Семенов В.М.,
Веремей И.С., к.б.н., доцент Побыржин В.В., к.в.н., доцент Субботина И.А.

Минск, 2017

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки эффективности терапии таргетными лекарственными средствами анти-Her2 группы, антрациклинами и таксанами, применяемых при лечении пациентов, страдающих злокачественными солидными новообразованиями, путем определения экспрессии генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) в циркулирующих опухолевых клетках (далее ЦОК) выделенных из периферической крови пациентов, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение злокачественных солидных новообразований.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, онкологов-хирургов, врачей-химиотерапевтов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим злокачественными солидными новообразованиями.

Уровень внедрения: учреждения здравоохранения, специализирующиеся на лечении злокачественных солидных новообразований и имеющие опыт использования молекулярно-генетических методов исследования (обратно-транскрипционная ПЦР).

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, лекарственных средств, изделий медицинской техники:

1. Пробирки стерильные вакуумные с К2ЭДТА объемом 5 мл для забора периферической венозной крови.
2. Термоциклер для Real-Time PCR.
3. Программное обеспечение термоциклера для анализа и протоколирования данных.

4. Пластиковые расходные материалы для термоциклера (RNA-se/DNA-se Free).
5. Микроцентрифуга скоростная (15000 об. мин.), пригодная для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.
6. Твердотельный термостат, пригодный для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.
7. Вортекс, центрифуга-вортекс.
8. Пробирки типа Эппендорф 1,5 мл.
9. Дозаторы механические или электронные переменного объема.
10. Одноразовые наконечники (обязательно наконечники с фильтром для предотвращения кросс-контаминации)
11. Наборы реагентов для выделения РНК, обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот.
12. Средства индивидуальной защиты (лабораторный халат, перчатки, очки)

Показания к применению

Злокачественные новообразования C00-C75 по МКБ-10 со стадией T0-4N0-3M0-1 по TNM классификации.

Противопоказания к применению

Отсутствуют.

Описание технологии использования метода с указанием этапов

1. Забор биологического материала.

Забор периферической венозной крови осуществляют утром натощак из локтевой вены в стерильную вакуумную пробирку объемом 5 мл с К2ЭДТА.

2. Определение экспрессии генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) в ЦОК.

2.1. Определение экспрессии гена ErbB-2/Her2-neu.

2.1.1. Из ЦОК выделяют РНК человека.

2.1.2. Проводят реакцию обратной транскрипции для получения кДНК.

2.1.3. Полученную кДНК используют для проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием необходимых пар праймеров и зондов для ErbB-2/Her2-neu и для контрольного референсного гена с-ABL затем проводят амплификацию по программе: 1 цикл: 95°C – 4 мин.; 45 циклов: 95°C – 30 с, 59°C – 1 мин., проводят детекцию флуоресценции по каналам FAM для гена ErbB-2/Her2-neu и FAM для гена с-ABL.

Наличие экспрессии гена ErbB-2/Her2-neu определяется по каналу FAM при этом значения порогового цикла находится в пределах от 18 до 35, и по каналу FAM для гена с-ABL значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35. Отсутствие экспрессии гена ErbB-2/Her2-neu определяется по каналу FAM – значение порогового цикла не определяется или больше 35, а по каналу FAM для гена с-ABL значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35.

2.2. Определение экспрессии гена Survivin (BIRC5).

2.2.1. Из ЦОК выделяют РНК человека.

2.2.2. Проводят реакцию обратной транскрипции для получения кДНК.

2.2.3. Полученную кДНК используют для проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием необходимых пар праймеров

и зондов для гена Survivin (BIRC5) и для контрольного референсного гена c-ABL. затем проводят амплификацию по программе: 1 цикл: 95°C – 4 мин.; 45 циклов: 95°C – 30 с, 59°C – 1 мин., проводят детекцию флуоресценции по каналам FAM для гена Survivin (BIRC5) и FAM для гена c-ABL.

Наличие экспрессии гена Survivin (BIRC5) определяется по каналу FAM при этом значения порогового цикла находится в пределах от 18 до 35, и по каналу FAM для гена c-ABL значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35. Отсутствие экспрессии гена Survivin (BIRC5) определяется по каналу FAM – значение порогового цикла не определяется или больше 35, а по каналу FAM для гена c-ABL значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35.

3. Интерпретация результатов.

3.1. В случае, если не определяется нормализованная экспрессия генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) в образце, то делают заключение об отсутствии в исследуемом материале ЦОК.

3.2. В случае, если определяется нормализованная экспрессии генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) одновременно, либо по отдельности в пределах 18 до 35 пороговых циклов, то делают заключение о присутствии ЦОК в образце.

3.3. В случае, если определяется снижение уровня нормализованной экспрессии генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) в образце вплоть до отсутствия последней относительно исходного уровня установленного до начала лечения, то делают заключение об эффективности проводимой терапии таргетными лекарственными средствами анти-Her2 группы, а также антрациклинами и таксанами.

4. Принятие управленческого решения.

В случае, если определяется или повышается уровень нормализованной экспрессии генов ErbB-2/Her2-neu и Survivin (BIRC5) в образце относительно исходного уровня установленного до начала лечения, то делают заключение об отсутствии эффективности проводимой терапии таргетными лекарственными средствами анти-Her2 группы, антрациклинами и таксанами, а также о прогрессировании опухолевого процесса.

Возможные ошибки при выполнении

Возможные ошибки могут быть связаны с нарушением протокола выделения РНК, синтеза кДНК, и проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени.