МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневич
_____2013

Регистрационный № 135–1113

МЕТОД ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В ПЛЕВРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ

инструкция по применению

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

Авторы:

д.м.н., профессор Клюкина Л.Б., к.м.н. Ерохина О.А., Гапанович Е.А.

Минск, 2013

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
29.11.2013
Регистрационный № 135-1113

МЕТОД ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ В ПЛЕВРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Л.Б. Клюкина, канд. мед. наук О.А. Ерохина, Е.А. Гапанович

Минск 2013

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью повышения точности цитологического исследования в определении характера процесса, установлении гистогенеза и органной принадлежности опухоли, что особенно важно у пациентов с невыясненным первичным очагом поражения.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики специализированных онкологических центров и диспансеров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1) центрифуга;
2) цитоцентрифуга типа Cytospin;
3) автомат для гистологической обработки ткани;
4) микротом;
5) водяная баня;
6) микроскоп.

Реактивы и расходные материалы

1) лабораторная посуда (колбы, центрифужные пробирки и микропробирки, пипетки, инструментарий для приготовления цитологических и гистологических препаратов, предметные и покровные стекла, автоматические дозаторы и наконечники к ним объемом 1–10, 20–200 и 100–1000 мкл);
2) формалин;
3) этанол;
4) ксилол;
5) дистиллированная вода;
6) 1 М раствор хлорида кальция ($CaCl_2$) и 1% раствор альгината натрия для приготовления клеточных блоков на центрифуге;
7) набор для приготовления клеточных блоков на цитоцентрифуге;
8) антитела;
9) реагенты для иммунофенотипирования (растворы для демаскировки, блокировки, визуализирующие системы — в соответствии с применяемыми антителами, табл. 1).

Таблица 1 — Характеристика антител и особенности обработки материала

Антитело	Клон	Предобработка	Разве-дение	Визуализирующая система
CEA	B01-94-11M-P	Нет	1:200	Link-Label
EMA	E29	Нет	1:200	Link-Label
Эпителиальный антиген	Ber-EP4	Target Retrieval Solution pH6,0	1:300	EnVision+
Антиэпителиаль-ный специфичес-кий антиген	MOC-31	Target Retrieval Solution pH6,0	1:30	Link-Label
Calretinin	DAK-Calret1	Target Retrieval Solution pH9,0	1:50	EnVision+
D2-40	D2-40	Target Retrieval Solution pH6,0	1:200	EnVision+
Wilm’s Tumor	CAN-R9	EZ-AR™2, Power Block	RTU	Polymer

	(IHC)-56-2			
p63	4A4	AR Citra Plus	1:20	Link-Label
TTF-1	BGX-397A	AR Citra Plus	1:30	Link-Label
ER	1D5	AR Citra Plus, Power Block	1:40	Link-Label
PR	1A6	AR Citra Plus,	1:20	Link-Label
Glut-1	SPM498	EZ-AR^{TM}2, Power Block	1:20	Polymer
CK 5/6	D5/16 B4	Target Retrieval Solution pH9,0	1:50	EnVision+

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика злокачественных опухолей в плевральной жидкости и установление метастатической природы гидроторакса.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Перечень и описание цитологических критериев дифференциальной и уточняющей диагностики злокачественных опухолей в плевральных жидкостях

1. Монослойное расположение клеток с атипией — группировки, в которых клетки с признаками атипии располагаются в один слой.
2. Скопления клеток с гладким контуром, содержащие до 50 клеток — группировки клеток, контур которых гладкий, общий для всех, количество клеток менее 50.
3. Скопления бугристые до 50 клеток — группировки, контур которых отчетливо бугристый, зубчатый, количество клеток менее 50.
4. Папиллярные структуры — трехмерные структуры с нагромождением клеток, по форме напоминающие виноградную гроздь.
5. Структуры шаровидные — группировки клеток шаровидной или слегка овальной формы, с гладким контуром, по их периферии располагаются ядра удлиненной формы.
6. Монопопуляция клеток — цитограмма содержит только одну популяцию диагностических клеток (фон не учитывается).
7. Неправильная форма клеток — неправильной считается любая форма клеток, за исключением округло-овальной, уплощенной.
8. Полиморфизм клеток — в цитограмме клетки различаются по форме и размерам.
9. Клетки-гиганты — клетки гигантских размеров (в 3 раза и более крупнее макрофага).
10. Многоядерные клетки с атипией — клетки, содержащие 2 или более ядер с атипией: ядра различаются по форме и размерам, хроматин перераспределен, ядерный контур неровный.
11. Цитоплазма плотная — цитоплазма, имеющая однородную структуру и насыщенную базофильную окраску.
12. Вакуоли баллоноподобные — крупные вакуоли в цитоплазме клеток, равные или больше размера сегментоядерного лейкоцита.
13. Хроматин гиперхромный — насыщенно окрашенный хроматин ядер.

14. Полиморфизм ядер — ядра различаются по размерам и форме.

15. Неровный контур ядра — наличие зазубрин, выпячиваний, вдавлений ядерной оболочки.

16. Высокий ядерно-цитоплазматический индекс — соотношение площади ядра к площади цитоплазмы 0,7 и выше.

Иммуноцитохимические исследования проведены на материале клеточных блоков. Для правильной трактовки результатов иммунофенотипирования следует оценивать локализацию экспрессии антитела (табл. 2) и процент окрашенных клеток. При цитоплазматическом или мембранном окрашивании менее 10% клеток-мишеней реакция считается отрицательной.

Таблица 2 — Локализация антитела в клетках-мишенях

Антитело	Локализация окрашивания
CEA	Цитоплазма
EMA	Цитоплазма и/или мембрана
Ber-EP4	Цитоплазма и/или мембрана
MOC-31	Цитоплазма и/или мембрана
Calretinin	Цитоплазма и/или ядро, реже сочетание мембрана/цитоплазма/ядро
D2-40	Мембрана, реже цитоплазма
Wilm’s Tumor	Ядро
p63	Ядро
TTF-1	Ядро
ER	Ядро
PR	Ядро
Glut-1	Цитоплазма
СК 5/6	Цитоплазма

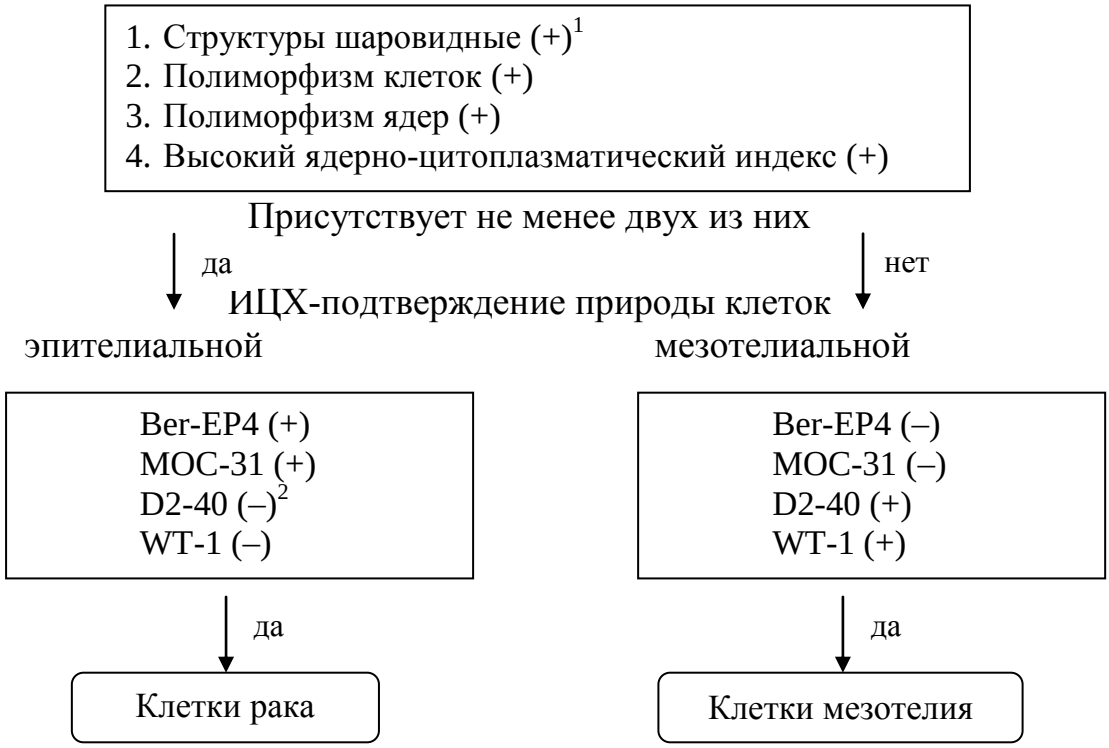
Используемые панели включают антитела, с помощью которых подтверждается высказанный врачом лабораторной диагностики или врачом-патологоанатомом на светооптическом уровне цитологический диагноз (положительная реакция), а также антитела, исключающие альтернативный диагноз (отрицательная реакция); при этом для убедительности оптимально использовать по два маркера для каждого вида предполагаемой патологии. Если реакция четырех или трех из избранных 4 антител соответствует предполагаемой патологии, диагноз следует считать верифицированным.

Отправной точкой применения настоящего метода являются клинические данные: диагностический алгоритм составлен в зависимости от того, имеется ли у пациента в анамнезе онкологическое заболевание или морфологическая диагностика осуществляется впервые на материале плеврального выпота. Если диагноз, установленный на основании цитоморфологических критериев, у врача лабораторной диагностики или врача-патологоанатома не вызывает сомнений, иммунофенотипирование не выполняется. В случае отсутствия уверенности в правильном заключении или противоречивости данных цитологического и клинико-инструментального исследований проводится иммуноцитохимический анализ.

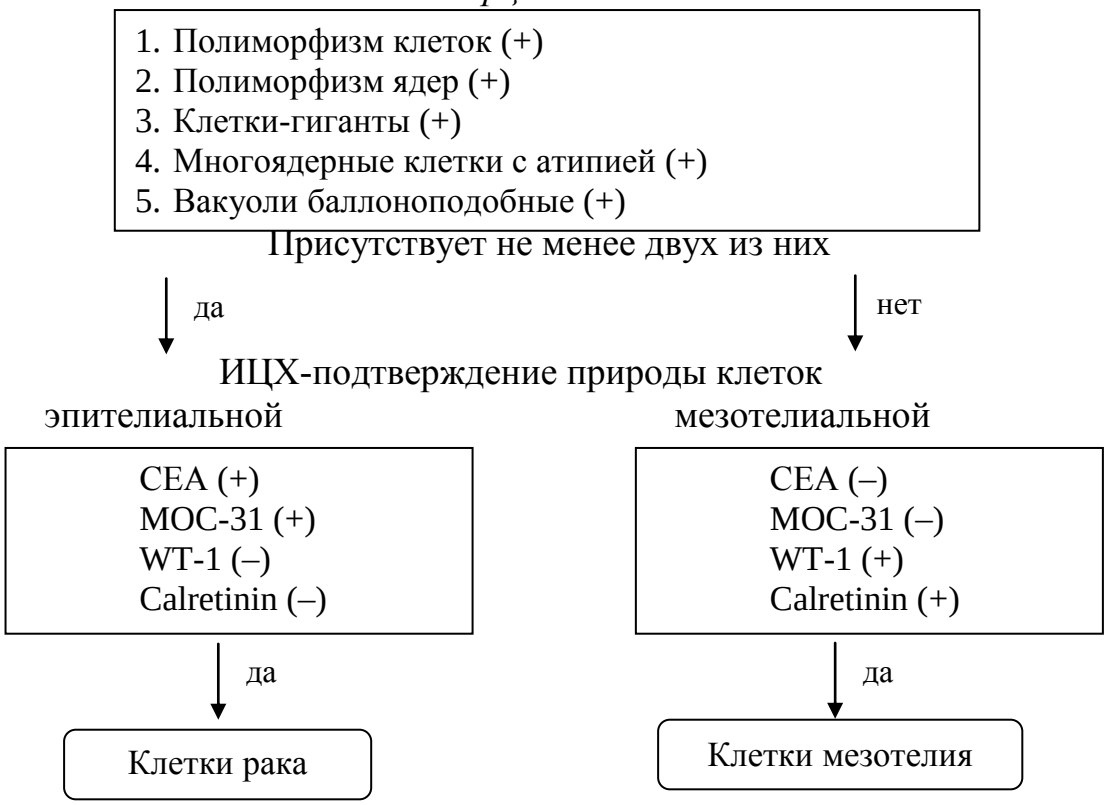
Технология использования метода дифференциальной и уточняющей цитологической диагностики злокачественных опухолей в плевральных жидкостях при известном первичном очаге

Дифференциальная диагностика проводится между клетками злокачественной опухоли, верифицированной у пациента ранее, и клетками мезотелия с реактивными изменениями.

Рак молочной железы (протоковый)



Аденокарцинома легкого



Плоскоклеточный рак легкого

1. Монослойное расположение клеток с атипией (+)
2. Полиморфизм клеток (+)
3. Полиморфизм ядер (+)
4. Неровный контур ядра (+)

Присутствует не менее трех из них

да

нет

ИЦХ-подтверждение природы клеток

эпителиальной

CEA (+)
MOC-31 (+)
WT-1 (–)
Calretinin (–)

да

Клетки рака

мезотелиальной

CEA (–)
MOC-31 (–)
WT-1 (+)
Calretinin (+)

да

Клетки мезотелия

Злокачественная мезотелиома

1. Монопопуляция клеток (+)
2. Многоядерные клетки с атипией (+)
3. Цитоплазма плотная (+)
4. Хроматин гиперхромный (+)
5. Высокий ядерно-цитоплазматический индекс (+)

Присутствует не менее трех из ни

да

нет

ИЦХ-подтверждение злокачественного характера процесса и природы клеток

эпителиальной

EMA (+)
Glut-1 (+)
WT-1 (+)
MOC-31 (–)

да

Клетки мезотелиомы

мезотелиальной

EMA (+)
Glut-1 (+)
WT-1 (–)
MOC-31 (+)

да

Клетки рака

Примечания:

1 (+) — признак присутствует или реакция положительная;

2 (–) — признак отсутствует или реакция отрицательная.

Технология использования метода дифференциальной и уточняющей цитологической диагностики злокачественных опухолей в плевральных жидкостях при не выясненном первичном очаге

Первостепенной задачей цитологической диагностики выпотных жидкостей является определение характера процесса. В зависимости от имеющейся информации об обследуемом пациенте, результатов микроскопического изучения мазков плевральной жидкости и задач, поставленных врачом-онкологом, врач лабораторной диагностики или врач-патологоанатом планирует и выполняет минимальный (определение характера процесса) или расширенный (уточняющая диагностика) спектр цитологического исследования.

Разграничить клетки реактивно измененного мезотелия и злокачественной опухоли с эффективностью 100% позволяет наличие хотя бы одного из четырех выделенных цитологических критериев злокачественности. Вместе с тем, не установлено строго патогномоничных признаков или комплекса цитоморфологических признаков, позволяющих с абсолютной точностью определить гистогенез и органную принадлежность злокачественных опухолей, что подтверждает обоснованность и диагностическую значимость применения иммуноцитохимического анализа.

I. Определение характера процесса

1. Полиморфизм клеток (+)[1]
2. Хроматин гиперхромный (+)
3. Высокий ядерно-цитоплазматический индекс (+)
4. Неправильная форма клеток (+)

нет →

ИЦХ: MOC-31 (–)[2]
EMA (–)
Glut-1 (–)
WT-1 (+)

Присутствует хотя бы один из них

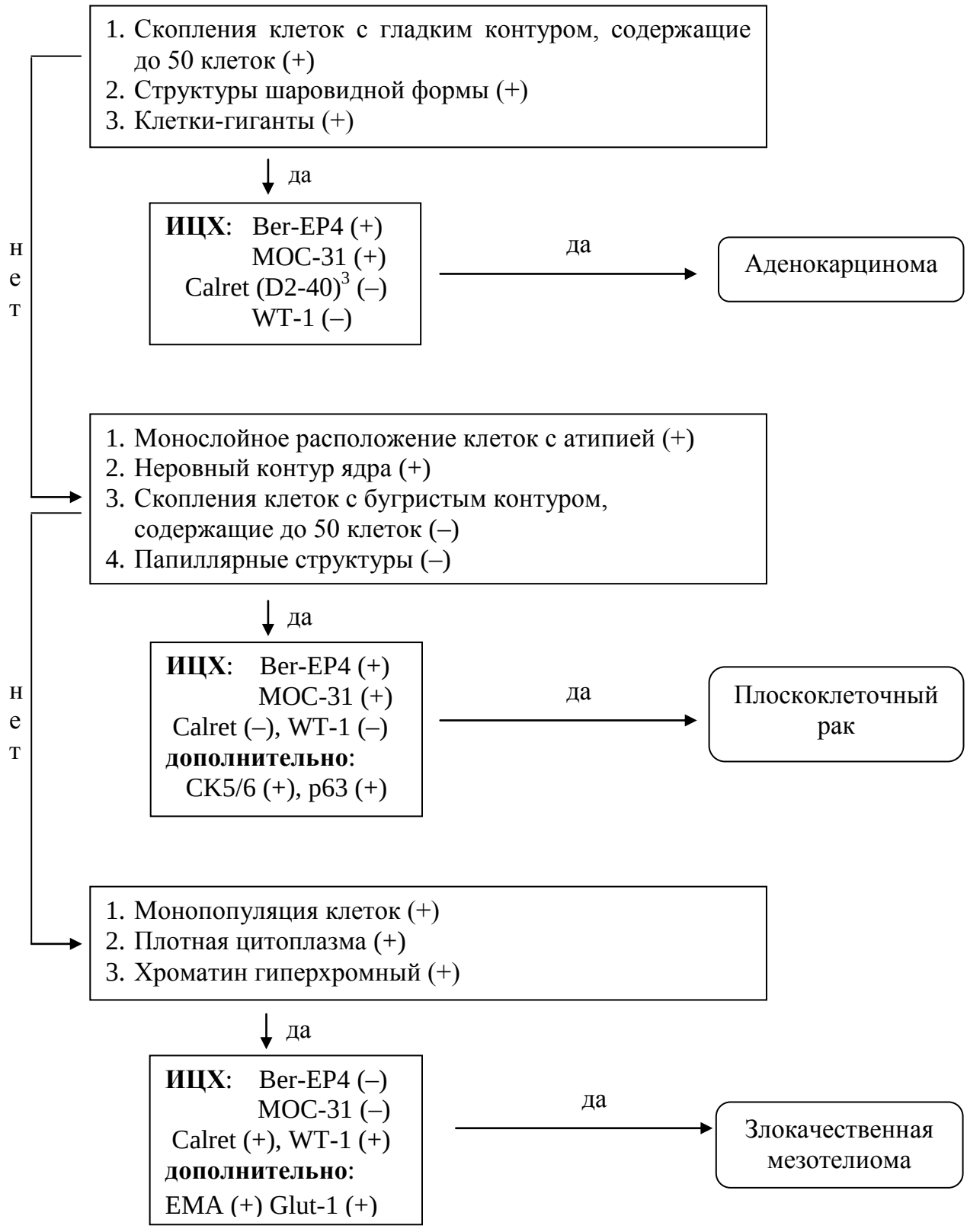
↓ да

Злокачественная опухоль

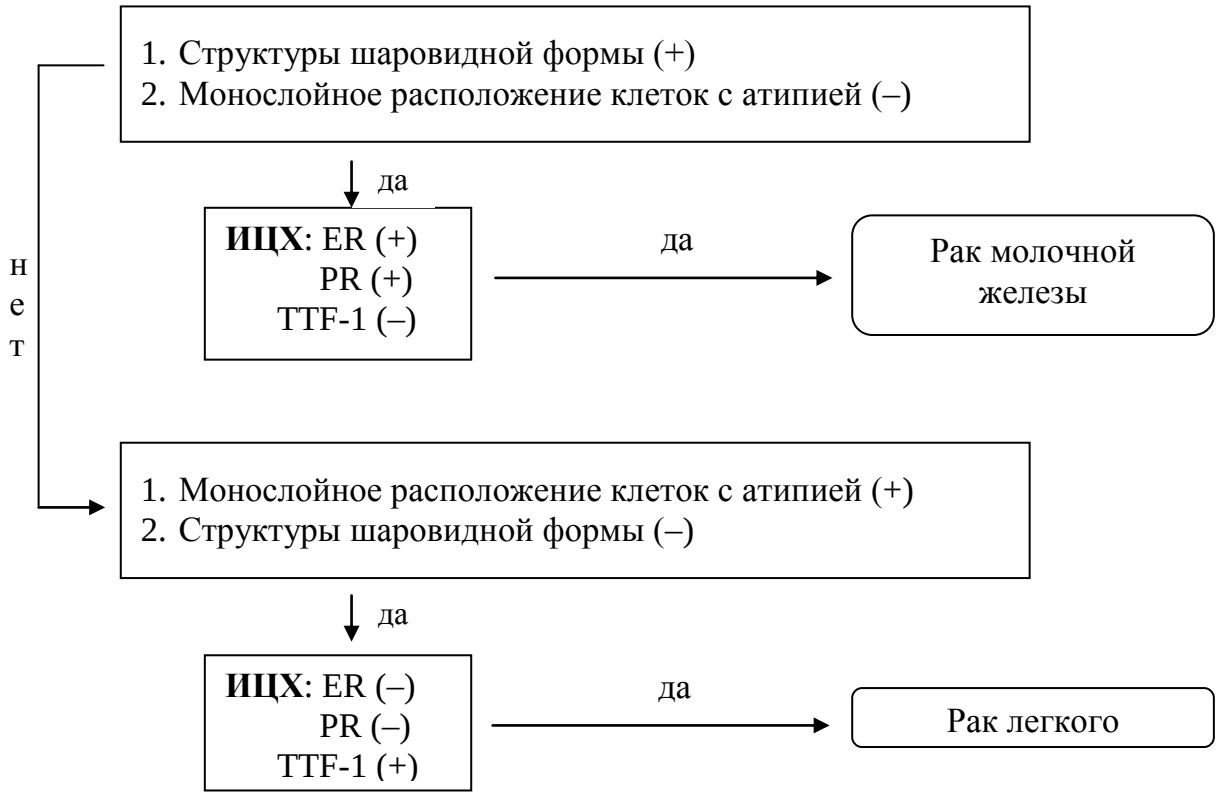
↓ да

Реактивный характер

II. Определение гистогенеза злокачественной опухоли



III. Определение органопринадлежности клеток злокачественной опухоли



Примечания:

1 (+) — признак присутствует или реакция положительная;

2 (–) — признак отсутствует или реакция отрицательная

3 — если имеется вероятность наличия рака молочной железы, вместо Calret лучше использовать D2-40.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки при диагностике могут быть обусловлены широкой вариабельностью цитологических и иммунофенотипических свойств опухолевых клеток, неправильной трактовкой цитологических признаков клеточных элементов, нарушением технологии иммуноцитохимического анализа, неправильной интерпретацией результатов иммунофенотипирования.

Сведения о возможных осложнениях, обусловленных микроскопией цитологических мазков, в литературе отсутствуют.