

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ С
ЭКСТРАКАПИЛЛЯРНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ В КЛУБОЧКАХ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», учреждение здравоохранения «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»

Авторы:

к.м.н. Летковская Т.А., Дмитриева М.В.

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

_____ И. Г. Лосицкий
27.04.2018
Регистрационный № 136-1217

**МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ
С ЭКСТРАКАПИЛЛЯРНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ В КЛУБОЧКАХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный
медицинский университет», УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое
бюро»

АВТОРЫ: канд. мед. наук. Т. А. Летковская, М. В. Дмитриева

Минск 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГН — гломерулонефрит
БПГН — быстро прогрессирующий гломерулонефрит
АНЦА — антинуклеарные цитоплазматические антитела
ГБМ — гломерулярная базальная мембрана
ЭП — экстракапиллярная пролиферация
ИФ — иммунофлюоресценция
ИК — иммунные комплексы
МИ ГН — малоиммунный гломерулонефрит
ВГН — волчаночный гломерулонефрит
ФСГС — фокальный сегментарный гломерулярный склероз
МБПГН — мембранопротеративный гломерулонефрит
МзПГН — мезангиопротеративный гломерулонефрит

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод дифференциальной диагностики морфологического типа гломерулосклероза с экстракапиллярной пролиферацией в клубочках, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний почек, требующих нефробиопсии. Метод позволит стандартизировать морфологическое исследование почечных биоптатов при гломерулосклерозе с экстракапиллярной пролиферацией в клубочках.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-нефрологов, врачей-ревматологов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим заболеваниями почек, в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Аппарат для автоматической проводки гистологического материала.
2. Ксилол.
3. Спирт этиловый различных концентраций.
4. Гистологические красители: гематоксилин Вейгерта А и В, эозин, Трихром, набор реактивов для ШИК (PAS)-реакции, набор реактивов для серебрения (метенамин-серебро по Джонсу), реактив конго красный (модификация Хаймана), фосфатный буфер.
5. Иммунофлюоресцентные поликлональные кроличьи антитела к человеческим белкам – иммуноглобулинам классов А, G, М, компонентам комплемента C3c и C1q, фибриногену, каппа и лямбда легким цепям/FITC; бычий сывороточный альбумин для разведения антител, водоотталкивающий ограничитель, протеолитический фермент, заливочная среда для флюоресцентного окрашивания.
6. Лабораторная посуда.
7. Микротом.
8. Предметные стекла.
9. Покровные стекла.
10. Канадский бальзам.
11. Микроскоп световой с люминесцентной насадкой.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Гломерулярные болезни (N00-N08).
2. Системные поражения соединительной ткани: узелковый полиартериит и родственные состояния (M30), другие некротизирующие васкулопатии (M31), системная красная волчанка (M32), пурпура и другие геморрагические состояния (D69).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

ПОЛУЧЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

1. Полученный путем чрескожной пункционной тонкоигльной нефробиопсии столбик ткани почки герметично запаковывают в маркированный флакон с достаточным объемом 10 % раствора нейтрального забуференного формалина (масса раствора должна превышать массу объекта как минимум в 5 раз).

2. К материалу должно прилагаться заполненное направление на пункционную биопсию почки с указанием фамилии, имени и отчества пациента, пола и возраста, даты взятия материала для исследования и количества полученных столбиков ткани, данные о предыдущих нефробиопсиях (если проводились). В направлении обязательно отметить предположительный клинический диагноз, данные анамнеза, осмотра и объективного исследования с динамикой лабораторных показателей (ОАМ, ОАК, БАК, иммунологический статус).

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ОПИСАНИЕ ПУНКТАТА

1. Извлечение из флакона всего присланного материала.

2. Описание точного количества присланных объектов. Измерение длины и диаметра столбиков ткани и их описание в биопсийной карте.

ОЦЕНКА АДЕКВАТНОСТИ НЕФРОБИОПТАТА

Для диагностики формы полулунного ГН важно наличие адекватного образца почечной ткани. Наиболее оптимальным является количество не менее 20–25 клубочков.

МЕТОДЫ ОКРАСКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ

Толщина срезов для окраски конго красным — 6–7 мкм, для остальных — 1,5–3 мкм.

1. Гематоксилин и эозин — базовая окраска.

2. Трихром по Массону либо MSB (Martius, Scarlet and Blue) для выявления коллагена.

3. Конго красный во всех случаях (для исключения амилоидоза).

4. Реактив Шиффа для общей оценки базальных мембран клубочков и канальцев, целостности капсул клубочков, выявления гиалиноза стенок сосудов.

5. Серебрение по Джонсу для оценки базальных мембран клубочков с целью выявления участков расщепления и двухконтурности, депозитов в виде «шипиков», вакуолек, участков неровности и «изъеденности» контуров и др., выявления коллагеновых и эластических волокон, аргирофильных включений в эпителиальных клетках канальцев;

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРИЗНАКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРИ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

1. Наличие и относительная пропорция капсулы почки, коркового и мозгового слоев.

2. Клубочки: общее количество, число (или процент) с глобальным и сегментарным склерозом.

2.1. Клеточная пролиферация: мезангиальная, эндотелиальная: фокальная или диффузная, глобальная или сегментарная.

2.2. Оценка ЭП: количество (процент) клубочков с ЭП, характеристика полулуний (клеточные, фиброзно-клеточные и фиброзные) размеры полулуний (до $\frac{1}{4}$ окружности капсулы Боумана, от $\frac{1}{4}$ до $\frac{1}{2}$ окружности, более $\frac{1}{2}$ окружности, циркулярные), подсчет индекса полулуния.

2.3. Выявление ранних признаков ГН с ЭП: активация подоцитов и париетальных эпителиальных клеток, формирование подоцитарных мостиков.

2.4. Базальные мембраны: тонкие, очаговое или диффузное утолщение, расщепление, двухконтурность, вакуолизация, «шипики», депозиты.

2.5. Капсула клубочков, утолщение, разволокнение, перигломерулярный фиброз и воспалительная инфильтрация (степень и клеточный состав).

2.6. Патологические процессы, включения и отложения (некрозы, тромбозы, расширение и интерпозиция мезангия).

3. Канальцы: извитые и прямые проксимальные, дистальные, собирательные трубочки.

3.1. Наличие атрофии и ее степень, «тиреоидизация», расширение или запустевание просветов, оценка щеточной каймы.

3.2. Дистрофия и некроз, их распространенность.

3.3. Базальные мембраны канальцев, их толщина, извитость, расщепленность.

3.4. Содержимое в просветах: белковые, эритроцитарные, зернистые цилиндры, некротизированный эпителий, детрит.

4. Строма: наличие склероза или отека и их характеристика — диффузный или очаговый процесс и степень (процент вовлечения в представленном фрагменте ткани).

4.1. Воспалительная инфильтрация: диффузная или очаговая, распространенность, распределение и клеточный состав, формирование гранулем.

4.2. Другие включения (бесклеточные — амилоид, гемосидерин, кальцинаты, клеточные — ксантомные, гигантские многоядерные клетки и др.).

5. Сосуды (артерии, вены, капилляры).

5.1. Описание всех слоев стенки (интимы, меди, адвентиции) и объема патологического процесса.

5.2. Некроз, его локализация, протяженность, по возможности — давность, воспалительная инфильтрация.

5.3. Склеротические изменения: степень фиброинтимальной пролиферации, фиброэластоз, склероз мышечного слоя, периваскулярный склероз.

5.4. Патологические изменения и включения в стенках сосудов (амилоидоз, гиалиноз, тромбоз, атероматоз, дисплазия).

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ИФ применяется для диагностики или исключения ИК ГН после гистологической оценки ткани почки, окрашенных гематоксилином–эозином и гистохимическими методами. Толщина срезов до 3 мкм.

Для каждого антитела обязательно описание локализации депозитов: в мезангиальных зонах, базальных мембранах клубочков, канальцев, интерстиции, стенках сосудов.

Описание характера отложений: нежно- или грубогранулярные, линейные, точечные и др.

Диагностика диффузного или очагового поражения, фокального или сегментарного.

Важно выявление не только самих компонентов иммунных комплексов, но и характера их отложений в различных структурах клубочков, степени экспрессии, которая оценивается полуколичественно от 0 до 3+.

1. Выявление иммуноглобулинов класса G: линейное свечение БМ клубочков характерно для антиГБМ нефрита; грубогранулярное в базальных мембранах и мезангиальном матриксе при ВГН, нежногранулярное небольшой интенсивности при IgA нефропатии и др.

2. Обнаружение иммуноглобулинов класса A; диагностика IgA-нефропатии или IgA-васкулита (различаются только по клиническим проявлениям — локализованное или системное поражение), ВГН и др.

3. Определение иммуноглобулинов класса M: отложения преимущественно в зонах склероза и мезангия при ФСГС, IgM-мезангиопролиферативном ГН, криоглобулинемическом поражении почек, ВГН и др.

4. Выявление компонента комплемента C3c: в мезангии и базальных мембранах клубочков с усилением по периферии сосудистых долек клубочков при МБПГН и С3-нефропатии, мезангиальные отложения при IgA-нефропатии; точечные отложения в базальных мембранах (по типу «звездного неба») при остром постинфекционном ГН, грубогранулярные депозиты при ВГН и т. д.

5. Обнаружение компонента комплемента C1q — основного для диагностики ВГН или C1q нефропатии (при преобладающем свечении); может также выявляться в зонах склероза клубочков и стенках сосудов.

6. ИФ-окраска на фибриноген и наличие некроза — более чувствительная, чем Трихром по Массону или MSB.

7. Каппа — легкие цепи являются маркером миеломной нефропатии, иногда положительны при амилоидозе, часто при ВГН, МН, МБПГН и др.

8. Лямбда — легкие цепи — маркер AL амилоидоза, парапротеинозов, часто выявляется в мезангиальных зонах при IgA-нефропатии, IgA-васкулите, ВГН и др.

9. Отрицательные результаты ИФ-исследования или следовое окрашивание наблюдаются в случаях неиммунного повреждения: БМИ, ФСГС и малоиммунного васкулита.

ФОРМУЛИРОВКА МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ДИАГНОЗА

1. Диагноз включает клинико-морфологические корреляции и гистологический паттерн поражения.

2. Обязательно указание на определенные патогенетические и клинико-морфологические категории заболеваний (например, фокальный некротизирующий и полулунный АНЦА гломерулонефрит с 60 % полулуний).

3. Необходима отметка о гистологических прогностических индикаторах, например, МЕССТ для IgA нефропатии, класс, индексы активности и хронизации для ВГН и др.

4. При необходимости представить варианты дифференциального диагноза.

ПРИМЕРЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Представлен 1 кусочек почечной ткани, содержащий 14 клубочков (11 склерозированы полностью), сохраненные гломерулы с утолщением капсул, полнокровны, с наличием фиброзно-клеточных полулуний. Мезангиальная пролиферация диффузная, умеренное расширение мезангиального матрикса. В одном клубочке фокус некроза капиллярных петель с сегментарным склерозом. Базальные мембраны утолщены на отдельных петлях. Склероз стромы выраженный диффузный (более 80 %). Эпителий тубул значительно снижен, тубулярные мембраны местами оголены. Белковые цилиндры в единичных просветах, умеренная атрофия канальцев. Лимфоидная инфильтрация диффузная из моно- и полинуклеаров. Интерлобулярные артерии с гипертрофией мышечного слоя и значительной фиброинтимальной пролиферацией. В некоторых — явления васкулита с лейкоцитами и мелкими фокусами фибриноидного некроза.

ИФ-данные. В зонах мезангия и базальных мембранах клубочков выявлено преобладающее свечение IgA ++, остальные компоненты — по +. В просветах гломерулярных капилляров свечение преципитатов с IgM++, фибриногеном +. В полулуниях свечение фибриногена, C1q, каппа и лямбда по ++. В стенках артерий и артериол IgM и C1q по +++; C3, фибриноген, каппа и лямбда по ++.

Гистоморфологический диагноз: с учетом клиники (геморрагическая сыпь) у пациента имеет место нефрит при пурпуре Шенляйн–Геноха (IgA-васкулит) с формированием полулуний во всех несклерозированных клубочках, фокальным сегментарным склерозом гломерул и мелким фокусом некроза. Склероз паренхимы и стромы выраженный, васкулит артерий стромы. Индекс полулуний — 2,0.

2. В биоптате 2 кусочка почки, содержащие 22 клубочка с формированием дольчатости, спайками с капсулой, диффузной мезангиальной пролиферацией, набуханием и пролиферацией эндотелиальных клеток с единичными лейкоцитами и единичными фибриновыми микротромбами в просветах капилляров. В 2-х клубочках (9,1 %) клеточные полулуния от $\frac{1}{4}$ до $\frac{1}{2}$ окружности, во многих набухание и активация подоцитов. Мезангиальный матрикс расширен, базальные мембраны выглядят диффузно утолщенными, с большим количеством интрамембранозных депозитов и участками расщепления. Склероз стромы незначительный (до 10 %), с очаговой незначительной лимфоидной инфильтрацией. Эпителий канальцев снижен, с дистрофией и избирательным некрозом. В некоторых просветах белковые массы. Стенки междольковых артерий без существенных изменений.

ИФ-данные: в представленных клубочках в зонах мезангия и базальных мембранах выявляется нежно- и грубогранулярное свечение IgM, IgG, C1q, C3 по ++, IgA, каппа и лямбда по ++, в капсулах клубочков IgM ++.

Гистоморфологический диагноз: с учетом клиники у пациента волчаночный гломерулонефрит по типу мембранопролиферативного поражения, с наличием

9 % клеточных полулуний и незначительным склерозом паренхимы. Класс 4, индекс активности 7/хронизации 1. Индекс полулуний — 0,23.

3. В биоптате 1 кусочек почки с наличием 24 клубочков, 1 из которых с глобальным склерозом. В 12 клубочках определяются полулуния, в основном клеточные, практически циркулярные, с фибрином и лейкоцитами и разрушением боуменовских мембран. В 2-х клубочках — полулуния фиброзные, с коллапсом оставшихся капиллярных петель. В 6 клубочках определяются некрозы капиллярных петель, в 3-х — сегментарный склероз. Остальные 6 клубочков выглядят практически не измененными, без мезангиальной пролиферации, однако в некоторых отмечаются спайки с капсулой, очаговое набухание эндотелиальных клеток и набухание подоцитов и эндотелиальных клеток. Базальные мембраны тонкие. Склероз стромы в представленном кусочке слабый, более выражен отек. Диффузная воспалительная инфильтрация (в основном из мононуклеаров) с примесью полинуклеаров (в т. ч. эозинофилов) и формированием лимфоидных фолликулов. Эпителий канальцев снижен, вакуолизирован, с дистрофией и избирательным некрозом. В просветах — скопления эритроцитов, белковых преципитатов, лейкоцитов и клеточного детрита. Стенки отдельных междольковых артерий и вены с продуктивным воспалением, неравномерным склерозом, пролиферацией интимы и фокусами разрушения эластической мембраны. Зоны некроза четко не видны. Реакция на амилоид отрицательная.

ИФ-исследование. В зонах склероза клубочков, в полулуниях и капсулах свечение C3c и C1q по +, в стенках артерий C1q +. Отложений иммунных комплексов в клубочках нет.

Гистоморфологический диагноз. У пациента картина малоиммунного экстракапиллярного (52,2 % полулуний) некротизирующего гломерулонефрита с тубулоинтерстициальным компонентом (острое и хроническое воспаление, канальцевый некроз и фиброз) с продуктивным васкулитом сосудов стромы в рамках системного процесса. Индекс полулуний — 2,1.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Ошибки в применении метода могут быть обусловлены:

- неправильным забором и фиксацией патоморфологического материала;
- использованием просроченных или неправильно хранившихся реагентов;
- неправильным разведением реактивов, несоблюдением временного и температурного режима при выполнении методики;
- при наличии неадекватного фрагмента ткани почки (менее 10 клубочков) есть риск пропустить фокальное поражение, когда повреждены не все клубочки;
- ограниченностью срока хранения препаратов для ИФ-исследования.

Во избежание возникновения ошибочных результатов необходимо строго соблюдать все методические требования при выполнении биопсии и гистологического, гистохимического и ИФ-исследования.

Протокол оценки клинических и морфологических параметров при гломерулопатиях с экстракапиллярной пролиферацией

ФИО		Пол: Жен муж
Возраст лет		год
Клиника (больница)		
Клинический диагноз	Номер биопсии	
Клинико-морфологический диагноз		
Давность заболевания	лет мес. недель дней	
Системность поражения	Кожа, суставы, легкие, ЖКТ, ЦНС, нос, пазухи, глаз, ухо, др. органы	
Сопутствующие заболевания	АГ Нет Да	
	Лабораторные данные	
ОАК	Эр. НВ СОЭ лейкоц. тромбоц.	
ОАМ	Белок эр. цили. бакт. лейкоц. сут. белок	
БАК	Мочевина креатинин общ. белок	
	холестерин СКФ	
Серологические маркеры	антиГБМ, АНЦА, антиДНК, АНА, АФС, АСЛО др.	
Клинические синдромы	Минимальный мочевого, изолированная протеину-/гематурия, нефротический (неполный, полный), нефритический, БППН, ОПН, ХПН	
	Гистологическое описание	
Количество столбиков	Количество клубочков	
Глобальный склероз ; %	Сегментарный склероз ; %	
Мезангиальная пролиферация	фокальная сегментарная, диффузная сегментарная, диффузная глобальная	
Расширение мез. матрикса	Да нет	
Клеточный состав	Эндотелиальные клетки, лейкоциты, эозинофилы, активированные подоциты, мостики, эпителий капсулы	
Другие характеристики	Микротромбы, мезангиолизис, интерпозиция мезангия, некроз капиллярных петель	
Базальные мембраны	Тонкие, утолщение, двухконтурность, разволокнение, шипики	
Полулуния: ; %	до ¼ ; %; до ½ ; %, более ½ ; %	
	клет. и фибр. клет % , фиброзные %	
Склероз стромы: %	степень 0 1 2 3	
Отек: степень 0 1 2 3	Воспаление: степень 0 1 2 3	
Клеточный состав	Моно-, полинуклеары, гранулемы, гигантские клетки, ксантомные клетки	
Канальца: Дистрофия	Белковая зернистая, гиалиновокапельная, жировая	
Некроз: степень 1 2 3	Цилиндры: белковые, эритроцитарные, зернистые	
Сосуды	Склероз, гиалиноз, эластофиброз, пролиферация интимы, фибриноидный некроз, тромбоз	
Индекс полулуний		
Общий	Без склерозированных клубочков	

Иммунофлюоресцентное исследование

АТ	Мезангий	Базальные мембраны	Сегментарный склероз	Полулуния	Капсула	Строма	Сосуды
IgA							
IgG							
IgM							
C3c							
C1q							
Фиброз							
Каппа							
Лямбда							
Паттерн							

Иммуносупрессия Да Нет
Исход Дата наблюдения Длительность наблюдения мес.
 Функция сохранена В течение
 Снижение функции Сразу, в течение через мес., лет,
 ПЗТ: диализ Дата
 трансплантация Дата
 Летальный исход Дата Через дн. мес. лет
 Причина

Дополнительные параметры

IgA-нефропатия и IgA-васкулит

M	E	S	T	C

Гистологический тип ГН при IgA-васкулите:

Волчаночный гломерулонефрит

Класс нефрита	Индекс активности	Индекс хронизации

Малоиммунный гломерулонефрит

Гистологический вариант:

АНЦА:

Анти-ГБМ:

Исследование выполнил..... _____